

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



***“GENES Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA: PROPUESTA
DE UNA HUELLA GENÉTICA PARA LA VALORACIÓN
DEL RIESGO”***

TESIS DOCTORAL

Antonio Gil Gómez

SeLiver Group. UGC Aparato Digestivo. Instituto de Biomedicina
de Sevilla. Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Sevilla 2019



**D. MANUEL ROMERO GÓMEZ, CATEDRÁTICO DE
UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: ***“GENES Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA: PROPUESTA DE UNA HUELLA GENÉTICA PARA LA VALORACIÓN DEL RIESGO”***, presentada por D. Antonio Gil Gómez para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Prof. Dr. Manuel Romero Gómez

Director y Tutor de la Tesis

7 de mayo de 2019



**D. JAVIER AMPUERO HERROJO, PROFESOR ASOCIADO
DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: ***“GENES Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA: PROPUESTA DE UNA HUELLA GENÉTICA PARA LA VALORACIÓN DEL RIESGO”***, presentada por D. Antonio Gil Gómez para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dr. Javier Ampuero Herrojo

Co-Director de la Tesis

7 de mayo de 2019

A mis padres.

Agradecimientos

En este momento tan importante, quisiera aprovechar estas líneas para mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que se han cruzado en alguna ocasión en mi camino, y que, de una forma u otra, me han hecho aprender, crecer y amar la vida.

Además, quiero dar las gracias a mis directores. Al Prof. Manuel Romero, quien no solo me ha dado la oportunidad de ejercer esta profesión, sino que, con su enorme capacidad de trabajo y dedicación me ha enseñado a respetarla y desempeñarla con pasión. En la misma línea, quisiera agradecer al Dr. Javier Ampuero su apoyo en el desarrollo de esta tesis, y de todos los proyectos pasados, presentes y venideros. Su visión me ha ayudado a comprender lo que es y lo que implica la investigación traslacional. Poder aprender y contar con la supervisión de ambos en estos años tiene un valor incalculable.

A todos mis compañeros, por enseñarme el valor del trabajo en equipo. No puedo arriesgarme a dejar a ninguno sin mencionar, y tan solo espero poder celebrarlo con cada uno de vosotros y devolveros todo lo que me dais en el día a día. Gracias a vosotros funciona la máquina y podemos hacer lo que hacemos, esperando que algún día el resultado de nuestro trabajo genere un beneficio en la salud. *Follow SeLiver*.

A mi familia, hermanas, cuñad@s y amig@s, especialmente para aquellos que me habéis sufrido más de cerca (porque no paro de hablar de lo mismo), o habéis notado mi ausencia (ahora sabéis lo que andaba haciendo). Aunque espero que esto sea el inicio de una larga carrera, prometo sacar más tiempo para dedicaros y compensar todo el cariño que

me dais. Quisiera tener un agradecimiento especial para todos los que, aunque ya no están, se les recordará siempre.

A mis padres; aunque ya lo dice la dedicatoria quiero que sepáis que todo esto es por vosotros. Mi padre, el espejo donde siempre he querido reflejarme, me preguntaba de pequeño por lo que quería ser de mayor y, aparte de jugar al fútbol con Michel y Butragueño, siempre le contestaba que inventor o científico. Con el tiempo me di cuenta, no importa a lo que te dediques; si alguna vez llego a ser la mitad de lo que él es, podré estar tranquilo de haber triunfado en la vida. Espero poder enorgullecerte como mereces. Mi madre, sin embargo, siempre me lo ha puesto más fácil con una falta de objetividad más que evidente. No obstante, el tiempo me ha hecho valorar esa confianza que siempre deposita en mí, independientemente de las metas que me proponga, y me da el valor para ir más allá de los límites que uno mismo se marca. A**E.

A Lula. Nos entendemos, nos comunicamos; si algún día, aunque fuera durante un instante pudieras comprenderme, tan solo te diría dos palabras.

Y por último y con más fuerzas, a Marta, más de media tesis debería de ser suya, por aguantarme y acompañarme cada día, por creer en mí, por apoyarme y estar conmigo en los momentos difíciles. Haces que todo tenga sentido y que cualquier esfuerzo merezca la pena.

Abreviaturas (en orden alfabético)

6-FAM: Amidita de fluoresceína.

AASLD: *American Association for the Study of Liver Diseases.*

ACLF: *Acute-on-Chronic Liver Failure.*

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIC: *Akaike information criterion.*

ALT: Alanina aminotransferasa 1 (EC:2.6.1.2).

ANT: *Animal naming test.*

AQP-4: *Aquaporin-4.*

AST: Aspartato aminotransferasa, citoplasmática (EC:2.6.1.1, EC:2.6.1.3).

ATP/ADP: Adenosín tri/di-fosfato.

BIC: *Bayesian information criterion.*

CEU: *Utah residents with northern and western European ancestry.*

CHES: *Changes in Health, End-stage disease and Symptoms and Signs.*

CLIF-C: *Chronic Liver Failure Consortium.*

CRT: *Continuous reaction time.*

DAMP: *Damage associated molecular pattern.*

DE: Desviación estándar.

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2.

EASL: *European Association for the Study of the Liver.*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EEG: Electroencefalograma.

EH: Encefalopatía hepática

EHGNA: Enfermedad hepática grasa de origen no alcohólico.

eQTL: *Expression quantitative trait loci.*

FCP: Frecuencia crítica de parpadeo.

FXR: *Bile acid receptor*.

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*.

GITC: Tiocianato de guanidinio.

GLP-1: *Glucagon-like peptide 1*.

GLS: *Glutaminase kidney isoform, mitochondrial*.

HGNC: *HUGO Gene Nomenclature Committee*.

HR (sHR): *Hazard ratio (subdistribution HR)*.

HTA: Hipertensión arterial

HVE: Hemorragia por varices esofágicas.

INR: *International normalized ratio*.

LOLA: L-ornitina L-aspartato.

MAF: Frecuencia alélica menor (en inglés).

MARS: *Molecular Adsorbent Recirculating System*.

MELD: *Model for end-stage liver disease*.

MeSH: *Medical subject heading*.

mPTP: *Mitochondrial permeability transition pore*.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

NES: *Normalized effect size*.

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico.

NTCs: *No template control*.

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*.

OR: *Odds ratio*.

PAMP: *Pathogen associated molecular pattern*.

PB: Pares de bases.

PBE: Peritonitis bacteriana espontánea.

PCR (qPCR): *Polymerase chain reaction (quantitative PCR)*.

PDGF: *Platelet-derived growth factor*.

PHES: *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*.

PYY: Péptido YY.

ROC (AUROC): *Receiving operator characteristic (area under ROC curve)*.

ROX: *Rhodamine X*.

SCFA: *Short chain fatty acid*.

SHR: Síndrome hepatorrenal.

SIP: *Sickness impact profile*.

SNP: *Single nucleotide polymorphism*.

SOG: Sobrecarga oral de glutamina.

SONIC: *Spectrum of neurocognitive impairment in cirrhosis*.

STRPs: *Short tandem repeats polymorphisms*.

TBE: Tampón tris-borato-EDTA.

TGFβ: *Transforming growth factor beta*.

TIPS: *Transjugular intrahepatic portosystemic shunt*.

TLR4: *Toll-like receptor 4*.

TLR9: *Toll-like receptor 9*.

T_m: Temperatura de fusión (del inglés, *melting*).

VNTRs: *Variable number tandem repeats*.

Resumen

Introducción y objetivos: Determinar el impacto de los factores genéticos en el desarrollo de encefalopatía hepática (EH) en pacientes con cirrosis.

Metodología: Se incluyeron pacientes con cirrosis hepática compensada [n=434; cohorte de estimación (n=294) y cohorte de validación (n=140)]. Los pacientes fueron seguidos hasta cinco años hasta el desarrollo de EH, trasplante o éxitus. Los pacientes fueron genotipados para 60 SNPs (genes candidatos con implicación en la fisiopatología de EH: inflamación, metabolismo de amonio y glutamina, integridad de la barrera intestinal y estrés oxidativo). De manera similar, se determinó un haplotipo formado por 4 SNPs y la longitud de un microsatélite en el gen *GLS* (Romero-Gómez et al. Ann Intern Med 2010). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante regresión de Cox y Kaplan-Meier para datos continuos y categóricos, respectivamente. Las variables significativas se introdujeron en modelos multivariantes por riesgos competitivos de acuerdo al método de Fine y Gray.

Resultados: En la cohorte de estimación, el análisis por riesgos competitivos mostró que las mutaciones en *GLS*, junto con aquellas en la región de influencia de *FUT2*-(rs601338), *TLR9*-(rs5743836), *SLC1A3*-(rs2562582) y *SLC1A5*-(rs313853), además del MELD, albúmina, sodio y los episodios previos de EH estaban independientemente asociadas al desarrollo de EH. Estos genes codifican para proteínas con una implicación dada en procesos tales como el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal mediante interacciones microbio-hospedador (*FUT2*), la respuesta inmune mediada por patógenos (*TLR-9*) y el transporte de glutamina (*SLC1A3* y *SLC1A5*). La combinación de estos factores de

acuerdo al número de alelos de riesgo nos permitió definir tres niveles de riesgo en estos pacientes: bajo, intermedio y alto [sHR: 1; 6.5 (1.8-22.9) $p=0.004$; 27.1 (7.5-96.8) $p<0.001$, respectivamente] (índice C=0.82). Este modelo de regresión mostró un rendimiento similar en la cohorte de validación [sHR: 1; 4.2 (1.2-14.3) $p=0.024$; 10.0 (2.7-36.7) $p<0.001$] (índice C=0.78). La supervivencia acumulada libre de EH a 5 años también se encontró influenciada por esta huella genética: 95.3%, 77.0% y 42.5% para los grupos de riesgo bajo, intermedio y alto (log-Rank 53.1; $p<0.001$) en la estimación, y 85.2%, 56.0% y 40.0% (log-Rank 14.1; $p<0.001$) en la validación.

Conclusión: La combinación de variantes desfavorables podría predecir EH. Esta huella genética podría implementarse en la práctica clínica como parte del proceso de toma de decisiones en el manejo de los pacientes con cirrosis hepática. Además, este trabajo pone de manifiesto el papel de estas rutas en la fisiopatología de EH y destaca el posible papel de nuevos genes como potenciales dianas terapéuticas.

Abstract

Background and Aims: To determine the impact of genetic factors on the development of hepatic encephalopathy (HE) in patients with liver cirrhosis.

Methods: Patients suffering from compensated liver cirrhosis [n=434; estimation cohort (n=294) and validation cohort (n=140)] were included. Patients were followed up for five years until HE bouts, liver transplant, or death. Patients were genotyped for 60 candidate SNPs (genes involved in the pathophysiology of HE: inflammation, ammonia and glutamine metabolism, intestinal barrier integrity and oxidative stress). Likewise, a haplotype formed by four SNPs within *GLS* plus the length of a microsatellite in the promoter region of *GLS* were determined (Romero-Gómez et al. Ann Intern Med 2010). Statistical analysis was performed by Cox regression and Kaplan-Meier for continuous and categorical data. Significant variables, and those known as weighted prognostic indicators, were entered into multivariable models by competing risks, according to Fine and Gray's method.

Results: In the estimation cohort, competing risks analysis showed *GLS* mutations, *FUT2*-(rs601338), *TLR9*-(rs5743836), *SLC1A3*-(rs2562582) and *SLC1A5*-(rs313853), together with MELD, albumin, sodium and previous episodes of HE as variables independently associated to HE development. These genes encode for proteins involved in maintenance of intestinal barrier integrity by host-microbial interactions (*FUT2*), pro-inflammatory response triggered by pathogens (*TLR-9*) and glutamine transport (*SLC1A3* and *SLC1A5*). Combining these genetic factors according to number of alleles at risk, three levels of risk patients were defined: low, mid or high

risk [sHR: 1; 6.5 (1.8-22.9) $p=0.004$; 27.1 (7.5-96.8) $p<0.001$, respectively] (C-index=0.82). This regression model performed in a similar manner in the validation cohort [sHR: 1; 4.2 (1.2-14.3) $p=0.024$; 10.0 (2.7-36.7) $p<0.001$] (C-index=0.78). Cumulative survival free of HE after 5 years was also influenced by this genetic fingerprint: 95.3%, 77.0% and 42.5% for the low, mid and high-risk groups (log-Rank 53.1; $p<0.001$) in the estimation, and 85.2%, 56.0% and 40.0% (log-Rank 14.1; $p<0.001$) in the validation cohort, respectively.

Conclusion: Combination of unfavorable variants could predict HE. This genetic fingerprint could be implemented in clinical practice for decision making in the management of cirrhotic patients. Besides, this work emphasizes the role of these pathways in the pathophysiology of HE and brings out novel genes as potential therapeutic targets.

Tabla de contenidos

A mis padres..... *iv*

Agradecimientos *v*

Abreviaturas (en orden alfabético) *vii*

1 INTRODUCCIÓN..... **1**

1.1 Generalidades de la cirrosis hepática**2**

 1.1.1 Fisiopatología 2

 1.1.2 Epidemiología..... 3

 1.1.3 Diagnóstico y clasificación..... 5

 1.1.4 Historia natural 7

 1.1.5 Complicaciones de la cirrosis 9

1.2 Encefalopatía hepática**12**

 1.2.1 Características clínicas y clasificación 14

 1.2.2 Diagnóstico 19

 1.2.3 Epidemiología..... 25

 1.2.4 Fisiopatología 26

 1.2.5 Tratamiento y manejo..... 38

1.3 Genética**42**

 1.3.1 Diversidad a lo largo del genoma..... 44

 1.3.2 Estudios de asociación vs. ligamiento 48

 1.3.3 Evidencias en encefalopatía hepática 50

2 HIPÓTESIS..... **53**

3 OBJETIVOS..... **55**

3.1 Objetivo principal.....**56**

3.2 Objetivos secundarios**56**

4 MÉTODOS..... **57**

4.1 Sujetos de estudio**58**

 4.1.1 Tamaño muestral 59

4.1.2	Recogida de datos.....	60
4.1.3	Diagnóstico.....	61
4.2	Muestras.....	65
4.2.1	Extracción y purificación de ADN.....	65
4.2.2	Cuantificación del ADN.....	66
4.3	Estudio de genes candidatos.....	67
4.3.1	Nomenclatura.....	67
4.3.2	Selección de genes candidatos.....	68
4.3.3	Selección de SNPs candidatos.....	69
4.3.4	Genotipado.....	71
4.3.5	Análisis microsatélite.....	77
4.4	Análisis estadístico.....	79
5	RESULTADOS.....	83
5.1	Características basales de los participantes.....	84
5.2	Variables asociadas con el desarrollo de EH.....	85
5.3	Genes y polimorfismos seleccionados.....	87
5.4	Análisis de polimorfismos.....	94
5.4.1	Genotipado.....	94
5.4.2	Análisis del microsatélite en el promotor de GLS.....	95
5.5	Polimorfismos asociados con el desarrollo de EH.....	97
5.5.1	Asociación de las variantes en <i>GLS</i> con el desarrollo de EH... 102	
5.6	Análisis multivariante.....	103
5.7	Validación huella genética.....	106
5.7.1	Cohorte de validación externa.....	106
5.7.2	Independencia de otros factores de riesgo.....	109
5.8	Análisis funcional <i>in silico</i> de las variantes asociadas a EH	
	117	

5.8.1	NC_000019.10:g.46784682T>C	117
5.8.2	NC_000005.10:g.36605258C>T	118
5.8.3	NC_000003.12:g.52226766A>G	120
5.8.4	NC_000019.10:g.48703417G>A	122
5.9	Utilidad de la metodología de genotipado de alto rendimiento	
	123	
5.9.1	Análisis de la eficiencia.....	123
5.9.2	Análisis del coste	125
5.9.3	Análisis del tiempo	127
6	<i>DISCUSIÓN</i>	129
6.1	Huella genética.....	130
6.2	Impacto.....	132
6.3	Estudio de asociación de genes candidatos.....	141
6.4	Conclusiones.....	147
7	<i>REFERENCIAS</i>	148
8	<i>ANEXOS</i>	186
8.1	Material suplementario.....	187

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la cirrosis hepática

El hígado interviene en procesos fundamentales como la digestión; además, segrega la bilis y varias proteínas plasmáticas, sirve como almacén de diversos nutrientes y participa en la eliminación de sustancias nocivas para el organismo. Es por ello que su ausencia, o falla en el funcionamiento, se considera incompatible con la vida. No obstante, se trata de un órgano con alta capacidad de regeneración, y muchas heridas que ocurren por algún daño agudo se curan sin la formación de cicatrices. Sin embargo, la mayoría de las enfermedades crónicas resultan en producción de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, en un proceso conocido como fibrosis, y que, junto a la regeneración de las células hepáticas y las alteraciones vasculares que tienen lugar con motivo de esas cicatrices, se produce la cirrosis y sus complicaciones asociadas (1). A pesar de que las consecuencias fatales a causa de un hígado dañado son conocidas desde la antigüedad, no fue hasta finales del siglo XVIII cuando se documentó por primera vez la apariencia mamelonada del hígado en autopsias de estos pacientes en los trabajos de Baillie, Morgagni y Laennec. Este último fue el que acuñó el término cirrosis, del griego “kirrhos”, debido al cambio de coloración del hígado que observó y anotó en su tratado (2).

1.1.1 Fisiopatología

La cirrosis hepática es una entidad patológica, punto final de la mayoría de enfermedades crónicas progresivas del hígado, resultado de diferentes mecanismos de daño hepático que producen necroinflamación y fibrogénesis (3). Histológicamente se caracteriza por la presencia de septos fibrosos cicatriciales difusos con sustitución de la arquitectura lobulillar por nódulos de regeneración, conllevando una alteración en la anatomía

vascular y la microcirculación hepática (4). En la patogenia de la cirrosis, las células hepáticas estrelladas juegan un papel fundamental, ya que producen las diversas formas de matriz que generan la fibrosis. Estas células, de características similares a un pericito, se encuentran en el hígado normal en la cara abluminal de las células endoteliales de los sinusoides en el espacio de Disse y, cuando se activan, se transforman en miofibroblastos (5). Las vías canónicas de cinasas mediadas por PDGF, TGF β y las vías de señalización de la integrina están implicadas en dicha activación (6). El desarrollo de fibrosis hepática es entonces conducido por la producción de diversas formas de matriz como la fibronectina o el colágeno 1, lo que a su vez ocasiona la activación de más células estrelladas y cambios en la arquitectura vascular (7). Estos cambios incluyen la reorganización de los sinusoides, formación de derivaciones intrahepáticas y disfunción endotelial, producida por la inhibición de la liberación de óxido nítrico (8).

1.1.2 Epidemiología

Las alteraciones descritas llevan por consecuencia el desarrollo de hipertensión portal e insuficiencia hepática (9). Sin embargo, la cirrosis no se considera una lesión estática, sino que, dependiendo de la actividad de la enfermedad causante, esta puede empeorar, estabilizarse o incluso mejorar. En términos de mortalidad, es la cuarta causa más común de fallecimiento en adultos en Europa, con una tendencia creciente, como muestra un incremento del 45,6% en los últimos veinticinco años a nivel mundial, suponiendo un total de 1,03 millones de muertes al año (10). No obstante, la estimación de mortalidad a un año puede oscilar entre el 1–57% dependiendo mayormente de la aparición de descompensaciones de la enfermedad, lo que pone de manifiesto la existencia de unos procesos

subyacentes con un dinamismo tal que hacen el pronóstico de la cirrosis muy variable (11). Todavía más si tenemos en cuenta que la fibrosis, aún en el contexto de un hígado cirrótico, puede regresar si se dispone de un tratamiento específico para la etiología en cuestión (12, 13).

Las principales causas de cirrosis en los países desarrollados son: infección por virus de la hepatitis C, consumo excesivo de alcohol y, cada vez más, enfermedad hepática grasa de origen no alcohólico (EHGNA); en el África sub-Sahariana y en el sudeste de Asia, sin embargo, la etiología más frecuente es la infección por el virus de la hepatitis B (14, 15). A pesar de que los nuevos tratamientos y el estilo de vida en los países desarrollados están cambiando las frecuencias de estas etiologías, en muchas ocasiones se sigue observando que el daño crónico hepático puede tener un origen mixto, observándose pacientes con cirrosis debido a hepatitis viral, obesidad y alcoholismo actuando de manera sinérgica (16). Otras causas menos frecuentes incluyen: enfermedades genéticas, yatrógenas, vasculares, autoinmunes o biliares (Tabla 1).

Se estima una prevalencia global de cirrosis del 0,3%, aunque varios estudios han puesto de manifiesto que puede existir una infraestimación por ausencia de diagnóstico sobre todo en ciertas áreas geográficas debido a, entre otras causas, que la cirrosis puede permanecer asintomática durante largos periodos de tiempo (17, 18). Tanto es así, que se ha calculado que aproximadamente el 40% de los casos pueden ser descubiertos en la autopsia, e incluso una elevada proporción podría quedar sin detectar (19).

Tabla 1. Etiologías de cirrosis. Modificado de Feldman et al., 2017

(7).

Víricas VHB VHC VHD	Tóxicas Arsénico Alcohol
Yatrógenas Fármacos: vitamina A, metotrexato Lesión biliar	Vasculares Fibrosis cardíaca Síndrome de Budd-Chiari
Autoinmunitarias Colangitis biliar primaria Colangitis esclerosante primaria Hepatitis autoinmune	Genéticas Déficit de lipasa ácida lisosómica Fibrosis quística
Biliares Atresia Litiasis Tumor	Metabólicas Deficiencia de alfa1-antitripsina Enfermedad de Wilson Galactosemia Glucogenosis Hemocromatosis Hepatopatía grasa no alcohólica y esteatohepatitis

1.1.3 Diagnóstico y clasificación

Debido a su carácter latente, la cirrosis en estadios tempranos puede ser descubierta de manera casual durante la exploración clínica (eritema palmar, arañas vasculares, ginecomastia, hipogonadismo, contractura de Dupuytren...), cribado por parámetros bioquímicos (transaminasas elevadas, hipoalbuminemia, plaquetopenia, hiponatremia...), gastroscopia o ecografía abdominal. En otros casos, se puede sospechar por la presencia de febrícula, astenia y pérdida de peso. Además, en ciertas ocasiones, se puede diagnosticar a través de otras técnicas de imagen como: tomografía axial computarizada, resonancia magnética, e incluso laparoscopia. No obstante, la biopsia hepática sigue siendo el método aceptado para el diagnóstico seguro de cirrosis en fases compensadas. Es sencilla, barata y relativamente segura, ya que en según qué fases de la enfermedad entraña

un alto riesgo de hemorragia debido a los bajos niveles de plaquetas y protrombina del paciente. De cualquier manera, la biopsia, además de confirmar el diagnóstico, permite establecer la gravedad, así como el grado de actividad histológica, el tipo morfológico y la etiología de la cirrosis (1).

En la práctica, el estadio de la cirrosis se clasifica según unos índices que miden la función hepática. El más utilizado es el Child-Pugh, que asigna un número y una letra dependiendo de la gravedad, y que permite establecer además el riesgo quirúrgico y el pronóstico global (20). Por otro lado, la escala de puntuación MELD se considera un índice pronóstico de la cirrosis avanzada, y se aplica principalmente en la priorización de pacientes candidatos a trasplante hepático (21) (Tabla 2).

Tabla 2. *Índices de clasificación de la disfunción hepática.*

<i>Clasificación de Child-Pugh</i>			
	1 punto	2 puntos	3 puntos
<i>Bilirrubina (mg/dL)</i>	<2	2-3	>3
<i>Albúmina (g/dL)</i>	>3,5	2,8-3,5	<2,8
<i>Protrombina</i>			
<i>Tiempo (seg)</i>	<4	4-6	>6
<i>INR</i>	<1,7	1,7-2,3	>2,3
<i>Ascitis</i>	Ausente	Leve	Moderada
<i>Encefalopatía Hepática</i>	No	Grado I-II	Grado III-IV
<i>Mortalidad</i>	<i>a 1 año</i>	<i>a 2 años</i>	
<i>Child A: ≤6</i>	0%	15%	
<i>Child B: 7-9</i>	20%	40%	
<i>Child C: ≥10</i>	55%	65%	
<i>Clasificación MELD</i>			
$MELD(i)=0.957\times\ln(creatinina)+0.378\times\ln(bilirrubina)+1.120\times\ln(INR)$			
0.643			
Si MELD(i) > 1:			
$MELD=MELD(i)+1.32\times(137-sodio)-[0.033\times MELD(i)\times(137-sodio)]$			

1.1.4 Historia natural

Diversos estudios han demostrado que la historia natural de la cirrosis no representa, como sí lo hacen otras enfermedades, un continuo de una sola entidad, sino que atraviesa varias etapas y cada una presenta diferente pronóstico, predictores de mortalidad y mecanismos fisiopatológicos. La evolución de esta enfermedad se caracteriza por una fase que cursa sin síntomas clínicos evidentes (cirrosis compensada), seguida de una fase de rápido desarrollo definida por la aparición de complicaciones derivadas del aumento de la hipertensión portal (y sus consecuencias hemodinámicas) y/o del empeoramiento de la función hepática (cirrosis descompensada) (22). El desarrollo de manifestaciones tales como hemorragia por varices, encefalopatía hepática, ascitis o ictericia marca la transición hacia cirrosis descompensada, que puede ocurrir en el 5-7% de pacientes por año (23). En este sentido, una revisión sistemática incluyendo 116 estudios demostró que los pacientes que presentan cualquiera de estas complicaciones tienen una supervivencia marcadamente inferior a los que sufren de cirrosis compensada (supervivencia a un año: 61% vs. 95%) (9).

Así bien, hemos de tener en cuenta que un paciente cuyas descompensaciones son controladas farmacológicamente no podría definirse como compensado ya que, aunque estas terapias pudieran inicialmente paliar las complicaciones, los mecanismos patogénicos que llevarían a su desarrollo estarían todavía presentes y no son mejorados por la terapia. Por ello, y conociendo la baja probabilidad de muerte que tienen los pacientes compensados (10% a 20 años), el objetivo global en este tipo de pacientes es la prevención de las descompensaciones más que prevenir la muerte en sí (24, 25).

Los avances recientes han profundizado en los mecanismos patogénicos subyacentes y en el pronóstico de cada fase, compensada o descompensada, permitiendo una sub-clasificación en cuatro etapas (Tabla 3). Las dos primeras etapas representan la cirrosis compensada, y se caracterizan por la ausencia de ascitis, aunque en la segunda puede haber varices sin hemorragia (signo de hipertensión portal). La etapa 3 se caracteriza por la presencia de ascitis con o sin varices esofágicas y en la etapa 4 se incluyen pacientes con hemorragia de varices en presencia o no, de ascitis (26). Se espera que en el futuro se pueda plantear una estadificación que tenga en cuenta, además de los parámetros histológicos y clínicos, los datos biológicos y que esto permita una estimación del pronóstico más ajustada (27).

1.1.4.1 Fallo hepático agudo sobre crónico

En los últimos años ha surgido el concepto de insuficiencia hepática crónica agudizada o ACLF (por sus siglas en inglés, *acute-on-chronic liver failure*) el cual incluye el agravamiento de la enfermedad hepática por algún daño agudo y conlleva asociado el fallo de algún órgano (más allá del hígado) y un marcado descenso de la supervivencia (mortalidad superior al 30% a 28 días) (28). Debido a que puede aparecer en pacientes en cualquier etapa de cirrosis, previamente descompensados o no, el ACLF se considera actualmente una etapa distinta de la cirrosis (Tabla 3). Este síndrome puede aparecer en el 24-40% de los pacientes que ingresan en el hospital por una descompensación, estando normalmente precedido de un evento precipitante, como una infección o hepatitis alcohólica (29). Sin embargo, el factor precipitante se desconoce en hasta el 40% de los casos. Se incluyen seis tipos de fallo orgánico: hepático, renal, cerebral, de la coagulación,

respiratorio y circulatorio (30). El pronóstico se puede calcular siguiendo la puntuación CLIF-C ACLF (disponible a través de: www.clifresearch.com/ToolsCalculators.aspx)(31).

Tabla 3. *Estadios de la cirrosis y sus mecanismos patogénicos.*

Clasificación histológica	Clasificación clínica	Síntomas	Estadio	Hipertensión portal (mmHg)	Mecanismos biológicos
F1-F3	No-cirrótico	-		<6	Fibrogénesis y vascularización
Cirrosis	Compensado	-	1	>6	Septos fibrosos gruesos, vasodilatación esplénica
		- (presencia de varices)	2	>10	Septos fibrosos gruesos, vasodilatación esplénica, nódulos
	Descompensado	Ascitis, hemorragia, EH	3	>12	
		Hemorragia y EH recurrente, Peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatorenal, ictericia	4	>20	Disminución del gasto cardíaco, vasodilatación, inflamación
	ACLF	Fallo multiorgánico			Inflamación, disfunción hepática

1.1.5 Complicaciones de la cirrosis

En un hígado cirrótico se producen una serie de alteraciones que conducen a la obstrucción del flujo de sangre y, por lo tanto, a un incremento de la presión en el sistema portal (32). De hecho, la mayoría de las complicaciones de la cirrosis se producen por hipertensión portal, la cual conlleva vasodilatación arterial periférica, sobre todo en el área esplénica, produciendo alteraciones hemodinámicas que comprometen la volemia efectiva y que conducen a una hipoperfusión de los órganos periféricos. Esta vasodilatación está producida por la producción a nivel endotelial de sustancias como óxido nítrico, prostaciclina y endocannabinoides. No obstante, en este estado también juega un papel esencial la inflamación crónica que presentan estos pacientes, los cuales tienen elevados niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (33). En esta etapa, además, los pacientes sufren una disfunción inmune que implica tanto

a la inmunidad innata como a la adquirida y que les hace altamente susceptibles frente a infecciones bacterianas. Todo ello conduce a un defecto en la translocación bacteriana y a una diseminación de subproductos bacterianos (PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*) en el torrente circulatorio. Por otro lado, tanto la apoptosis y necrosis celular como la inflamación local que ocurre en el hígado dañado, inducen la liberación de DAMPs (*danger associated molecular patterns*). A su vez, la presencia de PAMPs y DAMPs estimula la producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de nitrógeno y oxígeno. Esta cascada contribuye al desarrollo de la disfunción circulatoria y, junto con ella, favorece el fallo multiorgánico (34). De hecho, se plantea que, una vez la descompensación ha tenido lugar, la cirrosis se convierte en una enfermedad multiorgánica/sistémica.

1.1.5.1 Hemorragia digestiva por varices

El aumento de presión en la vena porta ocasiona que el flujo se derive a otros vasos con los que exista comunicación, provocando así la dilatación de venas esofagogástricas. Normalmente la hemorragia se produce sin causa precipitante conocida y se manifiesta por lo general como una hematemesis masiva o en forma de melenas. Aunque no se ha detectado una estricta correlación entre la hemorragia y la severidad de la hipertensión portal, está aceptado que, como norma, esta suele presentarse cuando la presión portal supera los 12 mmHg (35). Clínicamente son más relevantes las varices esofágicas, que pueden encontrarse en aproximadamente el 40% de los casos de cirrosis, y tienen una incidencia de 5-10% anual. A medida que aumenta el tamaño de la variz, mayor es el riesgo de hemorragia, llegando al 30% a dos años en pacientes con varices superiores a 5 mm (7). Por otro

lado, se ha calculado que el riesgo de fallecimiento tras un episodio agudo podría llegar al 20% en seis semanas (36). Así pues, ante la ausencia de tratamientos específicos, se recomienda el uso de β -bloqueantes para frenar el aumento de tamaño de las varices pequeñas a varices grandes (37).

1.1.5.2 Ascitis

El término ascitis describe la acumulación patológica de líquido en la cavidad abdominal como consecuencia de la hipertensión portal. Esta descompensación se manifiesta a través de un abdomen prominente acompañado en ocasiones de malestar o dolor, y es considerada la más complicación más común, afectando aproximadamente al 5-10% de cirróticos por año (38). Recientes investigaciones han reportado que el aumento de la presión podría ayudar a la liberación masiva de óxido nítrico, provocando vasodilatación. Esto conllevaría el aumento de hormonas vasoconstrictoras, que inducen la retención de sodio y fluido extracelular y, en esta situación, se produce un deterioro de la función renal (39). Asimismo, se ha descubierto que el estado de inflamación crónica que sufren estos pacientes es también responsable de la vasodilatación (33). La ascitis se puede clasificar en grados, de 1 a 3, en función de la cantidad de fluido en la cavidad abdominal; el diagnóstico es sencillo si la ascitis es voluminosa (grado 3), pero cuando el volumen es pequeño se hace uso de ultrasonografía o tomografía computarizada. Se suele tratar usando restricciones dietéticas de sodio, tratamiento diurético o infusión de albúmina intravenosa. En otras ocasiones, si es necesario, se elimina el líquido mediante paracentesis evacuadora ya que puede producir edemas, dificultades respiratorias por compresión del diafragma e hidrotórax hepático, así como infecciones (peritonitis bacteriana espontánea).

1.1.5.3 Peritonitis bacteriana espontánea

Debido a las deficiencias en la respuesta inmune y a la disfunción de la barrera intestinal, los pacientes cirróticos tienen un crecimiento excesivo de bacterias y una tasa elevada de translocación bacteriana. Este hecho aumenta el riesgo de desarrollar infecciones en el líquido ascítico, lo que se conoce como peritonitis bacteriana espontánea (PBE) (40). Esta complicación es el tipo de infección más frecuente en la cirrosis pudiendo afectar del 8-36% de los pacientes, con una supervivencia media cercana al 30% a un año tras el primer episodio, lo que sugiere un rápido empeoramiento de la función hepática (23).

1.1.5.4 Síndrome hepatorenal

Este síndrome se caracteriza por un fallo funcional severo del riñón en ausencia de anomalías histológicas conocidas. Tiene lugar en el contexto de unas alteraciones basales en la función cardiovascular, en la actividad del sistema nervioso simpático y en el sistema renina-angiotensina que provoca una vasoconstricción arterial renal intensa, con insuficiencia renal progresiva o incluso aguda (41). La frecuencia en pacientes cirróticos con ascitis puede llegar al 8% anual, y desarrollarse en hasta el 30% de pacientes ingresados con PBE. Esta complicación puede aparecer de manera espontánea o ser precedida por un factor precipitante, y es de carácter potencialmente reversible (42).

1.2 Encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática es una disfunción cerebral causada por un trastorno metabólico en el contexto de la insuficiencia hepática y/o

derivaciones portosistémicas. Este síndrome complejo se manifiesta con un amplio espectro de alteraciones neuropsiquiátricas que pueden abarcar desde un desorden cognitivo discreto hasta el coma profundo (43). El conocimiento de que la enfermedad hepática avanzada, lejos de ser un trastorno aislado del hígado, puede tener consecuencias en el estado de ánimo, el comportamiento y, en término final, en el funcionamiento del cerebro, podría remontarse al padre de la medicina occidental, Hipócrates (460-371 A.C.) (44). En su tratado, este describió el caso de un hombre con ictericia a quien no se le entendía y tenía un comportamiento agresivo; Hipócrates llegó a la conclusión de que estas alteraciones se podían deber a la “bilis negra” del hígado dañado que llegaba hasta la cabeza. Otro caso, aunque ficticio, llamativo por describir la realidad de la época, fue narrado por W. Shakespeare en su obra teatral “Noche de Reyes”. En ella aparece el personaje Sir A. Aguecheek, un caballero e intelectual inglés que, tras años de alcoholismo, muestra un comportamiento errático, timidez y torpeza en los movimientos (45). En la escena 3 del acto 1, el personaje comenta: *“I am a great eater of beef, but I believe that does harm to my wit”* (“Soy un gran amante de la ternera, pero mucho me temo que me daña la sesera”), lo que parece describir una enfermedad hepática subyacente y la presencia de un deterioro cognitivo (46).

En la actualidad, la EH se considera una complicación mayor de la cirrosis hepática, afectando de manera significativa la calidad de vida de los pacientes y sus cuidadores, amén de tener un gran impacto sobre los sistemas sanitarios en términos de utilización de recursos y costes médicos asociados (47, 48). De hecho, se ha demostrado recientemente que es una de las principales causas de readmisión en pacientes con cirrosis (49). Aunque hasta hace poco se consideraba que los pacientes se recuperaban

por completo tras sufrir un episodio de EH, actualmente se especula que estos episodios dejan secuelas y favorecen el deterioro cognitivo precoz (50, 51). Sin embargo, a pesar del alto impacto socioeconómico, los estudios clínicos en esta área son insuficientes y aún en la actualidad faltan normas estandarizadas para su definición, diagnóstico o tratamiento. Esto es debido, además, a una fisiopatología muy compleja que aún no está totalmente aclarada.

1.2.1 Características clínicas y clasificación

La EH presenta una semiología amplia y diversa, que se entiende como un continuo de menor a mayor gravedad, comprendiendo desde una entidad subclínica hasta el estado comatoso (52). A medida que la enfermedad progresa, se pueden detectar cambios neurológicos y psiquiátricos, todos ellos inespecíficos en: la personalidad (apatía, irritabilidad o desinhibición), la conciencia (desorientación temporo-espacial, estupor) y la función motora (asterixis e hiperreflexia) (53, 54). No obstante, las manifestaciones clínicas pueden variar no solo entre distintos pacientes, sino en el mismo paciente de manera longitudinal.

En este sentido, se ha descrito en los últimos años un estado de EH de bajo grado, la EH mínima, que se caracteriza por una ausencia de síntomas clínicos y en el cual solo se detectan pequeñas anormalidades comportamentales y en test específicos (55). Sin embargo, este estado se asocia igualmente a una mayor frecuencia de caídas (*odds ratio* (OR) 2,9), accidentes de tráfico (OR 4,5), así como a un mayor riesgo de hospitalización (*hazard ratio* (HR) 2,5) y muerte (HR 3,4) (56-58). Además, predispone al desarrollo de EH clínicamente manifiesta y a una progresión más rápida de la cirrosis (59-61). De esta manera, se ve afectada la calidad

de vida relacionada con la salud, teniendo un gran impacto sobre áreas con importantes consecuencias socioeconómicas, incluyendo el sueño y descanso, la interacción social, la gestión del hogar, el comportamiento emocional y el trabajo (62).

Debido entonces a su naturaleza inespecífica, este síndrome podría ser en ciertos casos indistinguible de un malestar general u otros factores que pudieran potencialmente comprometer la capacidad cognitiva, como el consumo continuo de manera abusiva de alcohol (63). Por ello, es necesario una correcta clasificación de la gravedad de la EH que permita establecer límites precisos entre los diferentes grados utilizando una nomenclatura estandarizada y consistente. El sistema que se propuso en 1998 (64) y que ha sido modificado en 2014 en la guía de práctica clínica publicada por las sociedades europea y americana (EASL-AASLD) (65), clasifica la EH de acuerdo a:

La enfermedad de base. Subdividiéndose en:

- Tipo A, ocasionada por insuficiencia hepática aguda.
- Tipo B, producida principalmente por derivaciones portosistémicas, sin necesidad de disfunción hepática.
- Tipo C, que se presenta en pacientes con enfermedad hepática crónica terminal e hipertensión portal.

La gravedad de las manifestaciones. Históricamente se ha clasificado la gravedad de la enfermedad de 0 a 4 siguiendo los criterios de West Haven, que subdividen el continuo de la EH basados únicamente en juicios clínicos (66). Las últimas actualizaciones de estos criterios incluyen la EH mínima (64). Esta clasificación es bastante precisa a la hora de distinguir pacientes en los límites superior e inferior de la escala, pero tiene

limitaciones a la hora de discriminar pacientes con grado 1 de aquellos con EH mínima o sin encefalopatía debido a una alta inconsistencia intra- e inter-observador. Por otro lado se encuentra la escala CHES, que organiza el espectro de EH de manera lineal en números de 1 a 9 y, aunque no se incluye, su desarrollo puso de manifiesto la importancia de tener en cuenta la asterixis como criterio en el diagnóstico (67). Así, esto permitió que en un informe de consenso de 2011 se incluyera la clasificación SONIC (por sus siglas en inglés, espectro de deterioros neurocognitivos en la cirrosis) que, aunque sigue sin ser universalmente usada, permite reflejar el espectro de hallazgos clínicos y mejora la clasificación clínica de EH (68). Según este criterio, no hay necesidad de distinción entre EH mínima de la EH grado 1, englobándose ambas en una nueva categoría llamada “encubierta” y determina que la observación de desorientación temporal es una característica clínica que permite distinguirla de la EH “manifiesta” (EH grado 2, 3 y 4) (Tabla 4). A pesar de ello, estudios recientes han confirmado que la EH mínima y Grado 1 son diferentes tanto en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes como en su pronóstico, poniendo de entredicho el uso del término “encubierta” (69).

Tabla 4. *Sistemas de clasificación de la gravedad de encefalopatía hepática según los criterios de West Haven y SONIC.*

Criterios de West Haven				SONIC			
Grado	Función intelectual	Función neuromuscular		Clasificación	Estado mental	Pruebas	Asterixis
0	Normal	Normal		Sin deterioro	No afectado	Normales	Ausente
Mínima	Exploración normal, cambios sutiles en el trabajo o la conducción	Anomalías leves de la percepción visual o en las pruebas psicométricas		EH encubierta	No afectado	Alteradas	Ausente
1	Cambios en la personalidad, déficit de atención, irritabilidad, estado depresivo	Temblor y descoordinación					
2	Cambios en el ciclo sueño-vigilia, letargo cambios de humor y comportamiento, disfunción cognitiva	Asterixis, marcha atáxica, anomalías en el habla					
3	Alteración del nivel de conciencia, confusión, desorientación y amnesia	Rigidez muscular, nistagmo, clonos, signo de Babinski, hiporreflexia					
4	Estupor y coma	Reflejo oculocefálico, falta de respuesta a estímulos nocivos					

La evolución en el tiempo. Según este criterio, la EH puede clasificarse en:

- Episódica.
- Recurrente, que indica el desarrollo de episodios repetidos en un intervalo de tiempo no mayor de 6 meses.
- Persistente, denotando un esquema de alteraciones comportamentales que se mantienen en el tiempo y pueden estar asociadas a reincidencias de EH manifiesta.

La presencia de factores precipitantes. Así, podemos diferenciar entre precipitada y no precipitada. En el primer caso, se deben identificar los factores precipitantes en todos los episodios de EH para poder tratarlos. Los factores observados con mayor frecuencia son: infecciones, sangrado gastrointestinal, descontrol en la dosificación de fármacos diuréticos, desbalance electrolítico y estreñimiento. No obstante, la complejidad del síndrome y las comorbilidades de estos pacientes hacen en muchas ocasiones imposible la tarea de identificar el factor desencadenante.

Por lo tanto, según las recomendaciones de las guías de práctica clínica vigente, cada paciente y episodio de EH debe describirse y clasificarse por un componente de cada una de las cuatro columnas que se resumen en la Tabla 5. Enmarcar el episodio actual de EH en el contexto de estos cuatro ejes obliga por tanto a los médicos a profundizar y potencialmente prevenir los factores desencadenantes, lo cual podría ayudar a prevenir los reingresos hospitalarios.

Tabla 5. *Descripción de EH. Modificado de Vilstrup et al., 2014.*

TIPO	GRADO		EVOLUCIÓN TEMPORAL	FACTOR PRECIPITANTE
A	EHM	Encubierta	Episódica	Espontánea
	I			
B	II	Manifiesta	Recurrente	Precipitada
	III			
C	IV		Persistente	

1.2.2 Diagnóstico

El diagnóstico y seguimiento de la EH es complejo, ya que el espectro de manifestaciones clínicas hace que las distintas estrategias comprendan desde escalas clínicas como las mencionadas anteriormente, hasta sofisticados test psicométricos y neurológicos, incluyendo además exploraciones complejas como son el electroencefalograma, la resonancia magnética, la espectroscopía cerebral o los potenciales evocados. No obstante, ninguna de las pruebas disponibles en la actualidad son válidas para analizar todo el espectro con el que se presenta esta entidad, por lo que las opciones diagnósticas varían en función al grado de deterioro (70).

Los criterios de West-Haven siguen siendo el *gold*-estándar, pese a que ciertos signos clínicos que se valoran podrían estar sometidos a la interpretación subjetiva del examinador (por ejemplo, la hipocinesia, la falta de atención y el enlentecimiento psicomotor podrían ser pasados por alto durante el examen clínico) (71). Además, hemos de recordar que tanto las manifestaciones neurológicas de la EH como las pruebas diagnósticas disponibles no son específicas de la condición y que el diagnóstico es, en consecuencia, de exclusión. Por ello, es importante antes de realizar las pruebas descartar otros factores de confusión tales como enfermedades

neuropsiquiátricas, el tratamiento con psicofármacos o el consumo activo de alcohol (72). Más aún, la presencia de otros trastornos concomitantes (hiponatremia, diabetes mellitus, sepsis, fallo renal, hemorragia intracraneal, etc.) puede ser otra causa/origen de deterioro cognitivo en pacientes con enfermedad hepática crónica, siendo difícil saber qué condición (EH o trastornos concomitantes) tiene una mayor contribución a la clínica del paciente (73, 74). De manera similar, y debido a que los pacientes con cirrosis tienen con normalidad edad avanzada, y que gracias a los avances en los cuidados médicos su supervivencia es cada vez mayor, la edad será un parámetro a tener en cuenta ya que pueden aparecer factores que afecten a la cognición independientemente de la enfermedad hepática. Esta distinción entre trastornos concomitantes o dependientes de la cirrosis (EH) es importante ya que al identificar correctamente todos los mecanismos causantes de las alteraciones se puede plantear un tratamiento individualizado. Así pues, una revisión reciente considera que el diagnóstico de EH se basa en cuatro factores: 1) una clínica característica, 2) la detección de fallo hepático o derivaciones portosistémicas, 3) exclusión de causas alternativas que expliquen el cuadro clínico y, 4) la respuesta del paciente a tratamientos para disminuir los niveles de amonio (72).

Por otro lado, ya se ha comentado que las fases de la EH que cursan sin síntomas clínicos tienen un gran impacto sobre la calidad de vida, pero que pueden pasar desapercibidas en la práctica clínica habitual. Esta condición altera la atención, la memoria operativa, la velocidad psicomotora y la capacidad visoespacial, siendo necesarias pruebas psicométricas y estudios neurofisiológicos para su diagnóstico (75, 76). Las

estrategias varían dependiendo de la logística del centro, de las normas locales y del coste incluyendo, entre las más consolidadas:

- **PHEs**. Consiste en una batería de cinco pruebas psicométricas de lápiz y papel diseñadas para detectar las alteraciones neuropsicológicas que se asocian a la EH mínima, capaces de evaluar la velocidad de procesamiento cognitivo y psicomotor así como la percepción visual, la orientación espacial, la concentración, la atención y la memoria del paciente (77). Se puede realizar en poco tiempo (unos 15 minutos) y la interpretación nos permite distinguir entre pacientes con y sin EH mínima. No obstante, y a pesar de ser una de las pruebas más utilizadas, artículos recientes ponen de manifiesto las deficiencias de este método diagnóstico (78).

- **Frecuencia crítica de parpadeo (FCP)**. Esta prueba psicofisiológica, denominada frecuencia crítica del parpadeo, se usó durante el siglo pasado para evaluar los efectos de ciertas drogas psicotrópicas sobre el sistema nervioso central. Se define como la frecuencia a la que una luz, presentada desde una frecuencia de 60 Hz a la baja, se muestra parpadeante al observador, y se introdujo en el contexto de la EH en un estudio llevado a cabo por Kircheis y colaboradores en 2002 (79). Los estudios han resaltado que valores inferiores a 39 Hz se asocian con una cognición deteriorada, y que estos valores se recuperan tras la terapia. Recientemente, nuestro grupo demostró que la evaluación según esta prueba, ajustada por el índice MELD, podía mejorar la predicción de supervivencia en el paciente cirrótico (80). Para la realización de la prueba se requieren varios ensayos, visión binocular intacta, incluyendo vista rojo-verde, así como el uso de un equipo especializado.

- **CRT.** El tiempo de reacción continua, que así se llama la prueba, calcula el tiempo de reacción frente a un estímulo, en este caso, cien tonos de 500 Hz a 90 dB en intervalos aleatorios de 2 a 6 segundos a través de unos auriculares. El paciente presiona un botón cuando lo oye, y se ha demostrado que el tiempo de reacción aumenta de manera proporcional al empeoramiento del estado neurológico del paciente (81). Además, el resultado no está condicionado por la edad o el sexo del paciente, y no hay efecto de aprendizaje o agotamiento en la prueba.

- **EEG.** El electroencefalograma produce datos objetivos del funcionamiento cerebral que, a diferencia de los test anteriores, son independientes de la cooperación del paciente o de influencias sociológicas. Estos resultados se han asociado en numerosas ocasiones a la severidad de EH. Sin embargo, la dificultad y subjetividad de su interpretación, así como su escasa sensibilidad han hecho cuestionar su utilidad (82).

- **Sobrecarga Oral de Glutamina (SOG).** Aunque no es una prueba que permita la detección de EH mínima, la Sobrecarga Oral de Glutamina es usada para determinar el pronóstico en este tipo de pacientes. Consiste en la administración vía oral de 10 gramos de L-glutamina en ayunas y la medición de los niveles de amonio circulantes a tiempo basal y 60 minutos tras la sobrecarga. El amonio aumenta, presumiblemente, debido a una mayor actividad glutaminasa en el epitelio intestinal (83). Este incremento como respuesta a la sobrecarga se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de EH durante el seguimiento. Más aun, un estudio reciente propuso que clasificando a los pacientes en función de la respuesta a

esta prueba se podrían identificar diferentes tipos de la enfermedad y por tanto, permitiría plantear un mejor manejo o estrategia terapéutica (84).

- **Pruebas de laboratorio.** Diversos estudios en los últimos tiempos han perseguido detectar la presencia de EH sin curso clínico mediante marcadores circulantes, susceptibles de ser analizados rutinariamente en las visitas de los pacientes. Es el caso de la 3-nitrotirosina, un metabolito producto de la nitración de la tirosina que se considera marcador reflejo del estrés oxidativo, y cuyos niveles en suero se encontraron aumentados en pacientes con EH mínima mostrando un alto rendimiento diagnóstico (85). No obstante, la necesidad de validación en cohortes mayores ha limitado su aplicación.

En este tenor, un metanálisis reciente ha propuesto que otras modalidades de diagnóstico, las denominadas “*point-of-care*”, se presentan como herramientas con una utilidad prometedora (86). Son gratis, fáciles de usar y nos permiten monitorizar las terapias intervencionistas. Sin embargo, este mismo estudio pone de manifiesto la necesidad crear un criterio de consenso para el diagnóstico en el que se establezcan puntos de corte bien definidos junto a tablas de distribución normal para ajustar las variables. Entre estas herramientas podemos encontrar:

- **ICT.** El *Inhibitory Control Test* mide la atención y la inhibición de la respuesta, identificando déficits en la función ejecutora y en el autocontrol. Los sujetos, frente a un ordenador, deben presionar un botón en respuesta a unas letras que van apareciendo en la pantalla cada 500 milisegundos. En 40 ocasiones, aparecen señuelos y el paciente debe evitar pulsar el botón. Se asoció

el número de fallos con el diagnóstico de EH mínima (87). Sin embargo, y a pesar de que la prueba ha intentado refinarse en varios estudios, el poder diagnóstico de estos “señuelos” ha ido empeorando con cada estudio.

- ***Stroop EncephalApp***. Esta prueba, disponible en forma de aplicación móvil, evalúa la atención selectiva a través del efecto *stroop*. Para ello, se muestran una serie de pantallas donde aparece el nombre de un color escrito en un color que no corresponde al nombre. Se mide el tiempo que necesita un paciente en hacer cinco series correctas (88).

- ***SIP***. El *Sickness Impact Profile* es una modificación de un cuestionario de calidad de vida relacionado con la salud, consistente en cuatro preguntas de respuesta si/no. A diferencia del resto de pruebas, no evalúa la capacidad cognitiva del paciente. El resultado, introducido en una fórmula de regresión, se ha usado en varios estudios para estratificar el riesgo (89, 90).

- ***ANT***. Para el desarrollo de la prueba ANT (*Animal naming test*) se le pide al paciente que nombre tantos tipos de animales como pueda en el tiempo de 60 segundos. Ajustando por el nivel de estudios y edad del paciente se obtiene una puntuación que se ha asociado al desarrollo de eventos de EH (91).

Con todo esto, queda claro que las pruebas diagnósticas para EH mínima o encubierta son relevantes ya que pueden ayudar a pronosticar el desarrollo de eventos de EH manifiesta y ser un indicativo de calidad de vida o estatus socioeconómico; estas pruebas servirían, además, para orientar a pacientes y cuidadores según el pronóstico, así como para priorizar las opciones de tratamiento. No obstante, la capacidad para

detectar EH mínima y predecir episodios de EH sigue siendo limitada; además, seguir esta estrategia no siempre es óptimo debido al coste que conlleva, a que las conclusiones del cribado no siempre son claras, y a que no siempre se recomienda un tratamiento. Más aún, la falta de homogeneidad entre distintas pruebas ha provocado que se recomiende una combinación de un mínimo de dos de ellas para el diagnóstico de EH mínima. Es por ello que todavía existe la necesidad de pruebas que representen una mejora en la precisión diagnóstica, que sean sencillos de aplicar y, sobre todo, que ayuden en la clínica en el proceso de toma de decisiones.

1.2.3 Epidemiología

La aparición de EH como una de las principales causas de reingresos, mortalidad y deterioro psicosocial en la cirrosis debe ser un hito para mejorar su gestión (92). En comparación con otras complicaciones de la cirrosis, como la ascitis o el sangrado por varices, la EH se asocia con un peor pronóstico, con una mortalidad a un año de hasta un 64% (93). Además, la tendencia demográfica actual hacia una población que envejece hace que el diagnóstico sea aún más difícil y aumenta la carga de la EH, ya que la mayoría de los pacientes en edad avanzada no son candidatos para trasplante de hígado (94). Se estima que este síndrome puede ser clínicamente evidente en un tercio de los pacientes con cirrosis en algún momento de su evolución clínica y que, si fuera testado de manera adecuada en toda la población en riesgo, hasta un 80% podría presentar cualquiera de sus formas subclínicas (55, 95, 96). En esta línea, se ha calculado que podría haber 7-11 millones de personas afectadas, con una incidencia anual de aproximadamente 150.000 nuevos casos solo en Estados Unidos (47).

En términos generales, el riesgo de un primer evento de EH manifiesta oscila entre 5-25% durante los 5 primeros años tras el diagnóstico de la cirrosis (97, 98). Asimismo, se ha detectado un riesgo acumulado de recurrencia a 1 año en individuos con EH previa cercano al 40% (99). Más aún, se ha estimado recientemente que los pacientes con cirrosis y una disfunción cognitiva discreta pueden desarrollar aproximadamente un evento de EH por cada 3 años de supervivencia (65). De cualquier manera, y como se ha esbozado a lo largo de estas líneas, la carga de la enfermedad hepática crónica está en rápido crecimiento y en muchas ocasiones existe ausencia de diagnóstico tanto de cirrosis como de EH. Por ello, se necesitan más datos para concretar más la epidemiología de la EH.

1.2.4 Fisiopatología

La patogenia de EH comprende una red compleja compuesta por diferentes factores, los cuales pueden estar influenciados por sistemas orgánicos interdependientes como pueden ser el gastrointestinal, renal, nervioso o el inmune. A pesar de que históricamente se ha considerado la acumulación de amonio como el principal factor en el desarrollo de EH, es cada vez más evidente que otros factores tales como la inflamación y el estrés oxidativo/nitrosativo podrían actuar de manera sinérgica (100). Entre los mecanismos fisiopatológicos conocidos se incluyen la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la producción de citoquinas, cambios en la síntesis y liberación de diversos neurotransmisores, estrés oxidativo a nivel neuronal, así como fallos en la función mitocondrial y fracaso osmótico resultado de los cambios en el metabolismo de los astrocitos (101-103).

1.2.4.1 Metabolismo de compuestos nitrogenados

A pesar de que los aspectos moleculares subyacentes al desorden neurológico en el fallo hepático agudo o crónico todavía siguen sin estar descritos por completo, se ha propuesto que los niveles de amoníaco (NH_3 gas + NH_4^+ ion) en sangre elevados podrían jugar un papel en la disfunción del sistema nervioso (104, 105). De hecho, diversos estudios han mostrado que factores que incrementan el amoníaco producen un empeoramiento de la EH, presentando correlación con la severidad y la mortalidad, mientras que la reducción farmacológica de estos niveles puede revertir los síntomas (106, 107). Además, ciertos modelos animales basados en el incremento de amoníaco plasmático o cerebral pueden recapitular las características clínicas y bioquímicas de la EH (108, 109). En la mayoría de los líquidos biológicos la forma protonada suele ser la especie más abundante (aproximadamente 98% a pH fisiológico 7,4, aumentando aún más a medida que descende el pH en determinados líquidos intersticiales) por lo que, en la mayoría de ocasiones, y de ahora en adelante a lo largo de este texto, se tendrá en cuenta la fracción de amonio como el total de amoníaco presente en el organismo.

El amonio se produce de manera masiva en el intestino delgado como un subproducto del metabolismo del nitrógeno llevado a cabo por la actividad de la enzima Glutaminase kidney isoform, mitochondrial (glutaminasa, EC:3.5.1.2) en el enterocito, así como por la acción de bacterias productoras de Urease (ureasa, EC:3.5.1.5) (110). El amonio producido es absorbido por el epitelio mucoso y transportado al hígado a través de la circulación portal. En un estado saludable, el metabolismo hepático del amonio ocurre en dos áreas: a) en los hepatocitos periportales a través del ciclo de la urea, el cual es una vía de alta capacidad de

detoxificación de amonio y b) en los hepatocitos pericentrales, gracias a la incorporación de amonio al glutamato por la actividad con alta afinidad de la enzima Glutamine synthetase (glutamina sintetasa, EC:6.3.1.2)(101). En un hígado dañado, y especialmente en uno cirrótico, donde se ha demostrado que existe hasta cuatro veces más actividad productora de amonio, los hepatocitos no pueden manejar la sobrecarga y el ciclo de la urea se satura (83). Cuando se llega a esta situación, los mecanismos alternativos de detoxificación en el músculo esquelético, riñones y cerebro se ponen en marcha (111).

Los astrocitos, las células gliales más abundante en el sistema nervioso central, llevan a cabo muchas funciones tales como proveer nutrientes y soporte mecánico a las neuronas circundantes. Son, además, piezas clave en el transporte y flujo de iones y neurotransmisores en el cerebro, amén de ser los principales componentes de la barrera hematoencefálica ya que envuelven con sus podocitos a las células endoteliales (112). Así, durante un estado de hiperamoniemia, los astrocitos protegen a las neuronas frente a la toxicidad del amonio gracias a la actividad de la enzima glutamina sintetasa, siendo éste incorporado al glutamato para formar glutamina (113-115). En condiciones de normalidad, este aminoácido se encuentra sobre 0,5 mmol/L en el intersticio cerebral, pero puede alcanzar la concentración de 9 mmol/L durante la hiperamoniemia (116). Esta sobrecarga produce la saturación del transporte de salida de glutamina ($K_m=1$ mmol/L), promoviendo su acumulación a nivel citosólico y mitocondrial y, por tanto, genera un estrés osmótico que causa hinchazón en los astrocitos. Además, en esta situación se produce una sobreestimulación de los receptores NMDA de glutamato, conllevando la entrada de calcio, la activación de la calmodulina y finalmente la

producción de óxido nítrico (117). De esta manera, la producción consecuente de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno van a inducir una serie de procesos: nitración de tirosinas, cambios en la señalización intracelular, movilización de zinc, oxidación de ARNs y alteraciones en la transcripción génica (101). Esta secuencia de eventos que tienen lugar, unido al daño mitocondrial producido por la toxicidad de estas especies (se forma el poro de transición de permeabilidad mitocondrial; del inglés, mPTP), son conocidos en la actualidad como la hipótesis del caballo de Troya (115, 118, 119).

Según lo expuesto, la hiperamoniemia no solo afecta a los órganos periféricos, sino que produce además alteraciones en la estructura y funcionalidad de los astrocitos y las neuronas centrales. En esta situación, se ha estudiado ampliamente la regulación a la baja que se observa en los transportadores Excitatory amino acid transporter 2 y GLyT-1 a nivel del astrocito. Esto previene el reciclaje de glicina y glutamato y promueve cambios en la neurotransmisión, ya que estas células controlan el flujo de neurotransmisores así como de energía, líquido e iones hacia las neuronas (120, 121). En este sentido, se ha descrito también que un desequilibrio en el potasio, que se acumularía extracelularmente, induce la activación del transportador neuronal Solute carrier family 12 member 2, desacoplando la neurotransmisión inhibitoria cortical (122). Este desequilibrio produce hinchazón de los astrocitos (se ha reportado una pérdida de expresión de GFAP y AQP-4) y activación de la microglía (123). A su vez, estos cambios incrementan la presión en el área circundante promoviendo el descenso en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas corticales sensorimotoras de la capa V así como de las piramidales CA1 del hipocampo (124, 125).

Esta podría ser la causa subyacente a la merma intelectual y motora asociada a los pacientes con EH.

1.2.4.1.1 Glutamina

La homeostasis del amonio está controlada principalmente por el metabolismo de la glutamina, llevado a cabo por la actividad de las enzimas glutaminasa y glutamina sintetasa, las cuales degradan y producen glutamina, respectivamente. En este sentido, estudios recientes han aportado evidencias de que, parte de los efectos negativos del amonio son, en realidad, producidos por el acúmulo de glutamina (115). Consecuentemente, se determinó que los niveles elevados de glutamina en el líquido cefalorraquídeo eran una característica distinguible de EH (126). Así pues, la glutamina sirve como un transporte lanzadera de nitrógeno entre distintos órganos, donde juega múltiples papeles; es precursor de proteínas y glicoproteínas, está implicado en la síntesis de purinas y pirimidinas en diferentes tejidos y es esencial en el mantenimiento del equilibrio ácido-base en el riñón, siendo el principal donante del amonio que es excretado en la orina (127). Curiosamente, tanto en el riñón como en el hígado, el esqueleto carbonado de la glutamina entra en el ciclo de Krebs y participa de la gluconeogénesis. La cantidad de glucosa producida a través de esta vía podría suponer hasta el 25% de la glucosa circulante total, siendo superior en el caso de que el paciente presente diabetes (128). De hecho, la glutamina se encuentra ligada a la secreción de insulina por las células β pancreáticas donde estimula la oxidación de glucosa, con un consecuente aumento del *ratio* ATP/ADP, induciendo así la despolarización de la membrana y un incremento de los niveles intracelulares de calcio, lo que produce la liberación de insulina al torrente sanguíneo (129). Además, la

glutamina sirve como combustible para las células del intestino, donde participa en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal (130). En el cerebro, por otro lado, está implicada en el ciclo glutamina/glutamato, en el cual la glutamina se sintetiza a partir del glutamato reabsorbido desde el espacio sináptico (131). Otra función importante es la producción de NADPH, el cual sirve para mantener el potencial redox en términos del *ratio* GSH/GSSG (127).

Finalmente, se ha descrito que uno de los principales roles de la glutamina en la patogenia de la EH es la formación del mPTP, un proceso definido por la apertura de un poro en la membrana interna de la mitocondria (115). Específicamente, se ha observado que la glutamina es transportada hacia la mitocondria donde es hidrolizada por la glutaminasa, aumentando así los niveles de amonio e induciendo la producción de radicales libres; estos últimos desencadenan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, los cuales, en última instancia llevan a la producción del mPTP y las alteraciones estructurales en los astrocitos (132, 133).

1.2.4.1.2 Glutaminasa

Esta enzima es responsable de una gran producción de amonio por su actividad en el primer paso de la glutaminólisis. De hecho, se ha encontrado que esta actividad está hasta cuatro veces aumentada a nivel duodenal en los pacientes con cirrosis, y se ha propuesto que podría ser una de las fuentes principales de esta neurotoxina (134). Más aún, la actividad está correlacionada con la presencia de EH mínima y con pacientes con una prueba de sobrecarga oral de glutamina alterada (83).

1.2.4.2 Inflamación

A pesar de que la relevancia del amonio en la patogénesis de la EH queda patente, se han encontrado algunas discrepancias en las correlaciones entre los niveles de amonio y la severidad de la enfermedad (135). De hecho, la hiperamoniemia no siempre desencadena EH y la disfunción cognitiva puede aparecer en pacientes con niveles normales de amonio, lo que sugiere que otros factores podrían actuar de manera sinérgica (136). En este sentido, la cirrosis descompensada puede producir tanto hiperamoniemia como inflamación sistémica, y actualmente se piensa que el incremento de amonio puede sensibilizar al cerebro ante estímulos inflamatorios sistémicos provocando una respuesta inflamatoria local aguda, la cual se podría ver agravada por la disfunción de los neutrófilos inducida a su vez por el amonio (137-139). En este tenor, Romero-Gómez *et al.*, encontraron que los pacientes con niveles elevados de óxido nítrico o TNFr2 mostraban un incremento de amonio mayor durante la prueba de sobrecarga oral de glutamina en comparación con los controles (140). Estos resultados confirmaron la relación entre la actividad productora de amonio y el estado inflamatorio, el cual ha sido también relacionado con el riesgo de translocación bacteriana y peritonitis bacteriana espontánea (141). Más aún, otro estudio concluyó que las células endoteliales cerebrovasculares incrementan la absorción de amonio tras la exposición a TNF-alfa (142). De manera similar, recientes hallazgos en modelos animales han revelado que la hiperamoniemia crónica induce la activación de la microglía y la neuroinflamación, pero también que ratones que reciben un estímulo de lipopolisacárido llegan a mostrar alteraciones cognitivas y motoras (139, 143).

Debido a su elevada susceptibilidad a las infecciones, los pacientes que padecen cirrosis avanzada presentan altos niveles de citoquinas proinflamatorias (144). Estas infecciones pueden resultar en ACLF y podrían ser factores desencadenantes de episodios de EH, siendo responsables de gran parte de la mortalidad asociada (145). En realidad, la presencia del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y los niveles de TNF-alfa e IL6 son factores determinantes y guardan correlación con la severidad de la EH en pacientes con cirrosis (146, 147). También se ha demostrado, años más tarde, que los niveles de estas citoquinas se encuentran asociados con la severidad de EH mínima, permitiendo incluso discriminar estos pacientes de individuos sin alteraciones (148). Más aún, y según un estudio reciente, estas citoquinas circulantes, y no los niveles de amonio, guardan correlación con los grados de EH mínima/encubierta y EH manifiesta (149).

Sin embargo, las citoquinas circulantes no pueden ejercer ningún efecto en el cerebro directamente ya que son incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica. No obstante, podrían tener influencia sobre la permeabilidad de esta barrera afectando a: la activación de las neuronas aferentes del nervio vago que permite el transporte de señales desde los tejidos periféricos hacia el cerebro; mensajeros secundarios (óxido nítrico y prostanoïdes) que son producidos en respuesta a citoquinas como TNF-alfa e IL-1 β ; el parénquima cerebral en zonas donde hay ausencia de barrera hematoencefálica (150). Así, podemos decir que la inflamación sistémica está estrechamente relacionada con la neuroinflamación ya que esta condición puede inducir la liberación de factores pro-inflamatorios en el cerebro por parte de las células endoteliales. Estos factores mediadores pueden además promover la activación de la microglia y así favorecer la

liberación de varios tipos de quimioquinas (151, 152). Concretamente, se ha estudiado los efectos de la sobreexpresión de C-C motif chemokine 2 en el deterioro asociado a EH (153). Además, varios estudios usando modelos animales (ratas con derivación porto-cava o ligadura del ducto biliar), han demostrado la contribución de la neuroinflamación en las alteraciones motoras y cognitivas y, por tanto, a la patogénesis de EH (109).

1.2.4.3 Eje intestino-hígado

El hígado y el intestino están comunicados entre sí a través del tracto biliar, la vena porta y la circulación sistémica. El hígado libera ácidos biliares y otros compuestos bioactivos al tracto biliar y a la circulación llegando, en última instancia, al intestino. Estos compuestos endógenos junto a otros exógenos (provenientes de la dieta y/o de la exposición ambiental), son degradados en el intestino por parte de las células del hospedador y de los microorganismos simbioses. Los subproductos de este metabolismo pueden volver al hígado y tener influencias sobre su funcionamiento regulando la síntesis de ácidos biliares y el metabolismo de la glucosa y los lípidos.

1.2.4.3.1 Microbiota

Gracias al reciente desarrollo de nuevas técnicas independientes de cultivo (*Next-Generation Sequencing*), la comunidad científica está acumulando nuevos datos y progresivamente resaltando el papel de la microbiota intestinal en la fisiología y la salud humanas. Tanto es así que se están produciendo cambios continuos en el paradigma de la fisiopatología de incontables enfermedades humanas. No obstante, se piensa que un equilibrio en el sistema gastrointestinal resulta en una simbiosis microbiota-

hospedador estable y saludable. De hecho, la microbiota intestinal tiene un número importante de responsabilidades estructurales y funcionales, estando implicada en el metabolismo de polisacáridos no digeribles, absorción de iones, lípidos y otros nutrientes, regulación del metabolismo de ácidos biliares e incluso producción de vitaminas (154). Además, su estabilidad es crucial en el mantenimiento de la función inmunológica, teniendo influencia tanto a nivel intestinal como sistémico (155). Al mismo tiempo, participa en la subsistencia de la barrera intestinal y, de la misma manera, sirve como barrera para otros microorganismos potencialmente patógenos, actuando a través de mecanismos de exclusión competitiva del nicho. A lo largo de la vida, son varios los factores que pueden determinar la composición de la microbiota de un individuo incluyendo: factores genéticos, dieta, exposición a antibióticos e incluso la localización dentro del tracto gastrointestinal.

El hígado es un órgano clave que se encuentra en la línea de transición de muchas interacciones entre el intestino y el metabolismo del hospedador, ya que está en contacto estrecho con el tracto gastrointestinal y, a su vez, expuesto a cantidades críticas de componentes bacterianos y sus productos (156). Por su posición anatómica se halla a medio camino entre los órganos periféricos y el sistema venoso porta, del que recibe hasta el 75% de la sangre que llega al hígado (157). Los cambios en la composición de la microbiota, tanto en número de especies (diversidad) como en cantidad total, se conoce como disbiosis, y es una situación que se ha asociado con la presencia de diferentes condiciones crónicas como enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad e incluso diabetes (158, 159); pero además se ha demostrado que contribuye a la patogénesis de la mayoría de las enfermedades hepáticas como hígado graso de origen alcohólico y no

alcohólico, enfermedades colestásicas, progresión de fibrosis a cirrosis e incluso complicaciones de éstas, como la EH (160).

Los cambios que se producen pueden alterar, por ejemplo, la capacidad de digerir fibras solubles en ácidos grasos de cadena corta (por sus siglas en inglés, SCFAs), los cuales inducen la liberación de hormonas gástricas como PYY y GLP-1 a través de su unión a receptores acoplados a proteína G en las células enteroendocrinas. De esta manera, los SCFAs pueden regular la motilidad y la tasa de tránsito intestinal, así como el rendimiento de energía obtenida de la dieta y las rutas de señalización de insulina (161). Más aún, se ha demostrado que el butirato y otros SCFAs pueden tener efectos a nivel cerebral a través de la modulación del medio inmune (162). De acuerdo con las afirmaciones anteriores, se ha propuesto la existencia de un bucle de retroalimentación que explicaría el impacto de la fibra (polisacáridos no digeribles) en la diversidad de la microbiota: la dieta que ingerimos da forma a nuestra microbiota y su metabolismo, regulando así el estado de la barrera mucosa colónica (se ha encontrado que *Bacteroidetes thetaiotaomicron*, un generalista nutricional, tiene la capacidad de alternar su metabolismo de estos polisacáridos a glucanos de la mucosa en la ausencia de fibra); por otro lado, estos cambios regulan la absorción de nutrientes a nivel intestinal (163).

En el contexto de la cirrosis se han detectado con frecuencia alteraciones de la flora intestinal, incluyendo el crecimiento excesivo en el intestino delgado de bacterias gram negativas potencialmente patógenas, las cuales pueden contribuir en alguna forma a la producción de amonio o de la respuesta inflamatoria sistémica (164, 165). En concreto, y de manera paralela a la progresión de la cirrosis, se ha observado una reducción de los comensales autóctonos en favor de especies pertenecientes a

Enterobacteriaceae o *Streptococcaeae*, que pueden producir tanto endotoxina como amonio a través de su actividad ureasa (166, 167). Además, la hipertensión portal, el daño oxidativo y el defecto en la secreción de Inmunoglobulina A que se da en los pacientes cirróticos produce desperfectos en el la barrera intestinal, aumentando su permeabilidad (168-170).

En relación con la EH, se ha descubierto que la tasa de disbiosis, calculada como la *ratio* de taxones autóctonos frente a los no autóctonos, está asociada con la enfermedad (171). Por ejemplo, Zhang *et al.*, han mostrado recientemente que dos familias de bacterias se encontraban mayormente representadas en pacientes cirróticos con y sin EH mínima frente a controles. Además, encontraron que la abundancia de *Streptococcus salivarius* era significativamente mayor en los pacientes con EH mínima y que se correlacionaba con los niveles de amonio (172). De manera similar, Bajaj *et al.*, encontraron una relación positiva entre la degeneración de la función cognitiva en cirróticos y los niveles de *Porphyromonadaceae* y *Alcaligeneaceae* (173). Por otro lado, se ha visto que los niveles de amonio elevados pueden inducir una parálisis inmune debido a que provocan la disfunción de neutrófilos y macrófagos. Esto conlleva una mayor tasa de translocación bacteriana, que puede ocasionar peritonitis bacteriana espontánea (174). De esta manera, las bacterias y sus subproductos pueden generar un estado inflamatorio, a través de la activación de los macrófagos hepáticos vía agonismo de los receptores *Toll-like* (175). Las endotoxinas, semejantemente a las citoquinas, son incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica, pero incrementan su permeabilidad y finalmente actúan sobre el parénquima cerebral (176).

1.2.4.3.2 Ácidos biliares

La mayoría de los ácidos biliares que son secretados en el duodeno provenientes del hígado son captados por los enterocitos a través de un transporte activo, liberados al torrente sanguíneo y captados de nuevo por el hígado. Sin embargo, en un hígado dañado los ácidos biliares se acumulan y se han descrito niveles circulantes aumentados en enfermedades crónicas hepáticas de distintas etiologías (177). De hecho, su valor predictivo para detectar descompensaciones o el desarrollo de ACLF está en estudio (178). Consecuentemente, en un modelo animal de ligadura del ducto biliar, se ha detectado también un incremento de los ácidos biliares en circulación y curiosamente esto se correlaciona con una pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica (179). En este sentido, se ha descubierto la presencia de grandes cantidades de ácidos biliares en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EH (180). Es por ello que está siendo estudiado el papel de los ácidos biliares e incluso la bilirrubina en el desarrollo de EH. Uno de los mecanismos que ha llamado la atención es la vía de señalización del *Bile acid receptor*, el cual, bien a través del control de neurotransmisores o bien del mantenimiento homeostático del colesterol, podría jugar un papel en la aparición de la EH. De hecho, ratones FXR^{-/-} muestran alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica, serotoninérgica y glutamatérgica, y presentan un comportamiento depresivo, ansioso y con cambios en la actividad motora (181).

1.2.5 Tratamiento y manejo

A pesar del gran impacto social y los numerosos estudios que se han llevado a cabo, la falta de uniformidad en la clínica de la EH sumada a la cantidad de factores que pueden desencadenarla hacen que aún no se hayan

encontrado evidencias sólidas sobre la efectividad de la mayoría de las medidas terapéuticas propuestas. El tratamiento farmacológico específico se considera parte del manejo, pero aún hace falta la consecución de ensayos clínicos bajo una estricta regulación que asegure la efectividad. En la actualidad, solo se tratan los episodios de EH manifiesta siguiendo una aproximación dependiente de la severidad en la presentación.

No obstante, se han aceptado una serie de medidas sobre el manejo en donde la primera prioridad consiste en identificar y eliminar, dentro de lo posible, el/los factor/es desencadenante/s (tales como hemorragia, infección, desequilibrio electrolítico, medicación, etc.) (65). Por otro lado, el amonio sigue siendo una de las dianas principales y se persigue reducir la producción y maximizar la eliminación para disminuir sus niveles en sangre evitando así sus efectos sobre el sistema nervioso (72). Sin embargo, no se tiene en cuenta a otros factores determinantes en el desarrollo de la enfermedad como el estrés oxidativo o la inflamación. Otra medida se basa en el mantenimiento del estado nutricional del paciente, que suele ser deficitario, sobre todo en estadios avanzados de la enfermedad. Como se ha mencionado anteriormente, el músculo es un órgano que puede eliminar gran cantidad del amonio acumulado en el lecho portal y, por tanto, se considera importante evitar el catabolismo proteico y la pérdida de masa muscular en pacientes con EH, para así asegurar un balance nitrogenado estable. En el pasado se ha llegado a recomendar dietas hipoproteicas, aunque los últimos estudios han demostrado que no tienen efectos favorables para este tipo de pacientes y que los requerimientos de estos nutrientes son los mismos que los de pacientes con cirrosis *per se* (182). Además, se ha propuesto como beneficioso el consumo de proteínas vegetales y lácteas por encima de las de origen animal o el uso de

suplementos con alta proporción de aminoácidos ramificados, los cuales pueden inducir la ganancia de masa muscular y estimular la síntesis de proteínas (183). Finalmente, la prevención de la recurrencia debe ser un factor importante a manejar, sobre todo conociendo que el riesgo de sufrir un episodio es mayor en pacientes previamente experimentados. Por ello, la profilaxis debe ser de obligado cumplimiento.

Entre los fármacos más utilizados en la actualidad, podemos encontrar:

- **Disacáridos no absorbibles.** La lactulosa o el lactitol se metabolizan en el colon dando lugar a subproductos con efectos laxantes. Además, producen una disminución del pH intestinal, lo cual inhibe la absorción de amonio y la translocación bacteriana (184). Aunque su efecto ha sido objeto de discusión durante años, un reciente meta-análisis ha demostrado que su uso es beneficioso en la prevención y tratamiento de la EH (185). A pesar de que los efectos secundarios son frecuentes, su uso está generalmente extendido. Por otro lado, ensayos clínicos aleatorizados han demostrado que la terapia con polietilenglicol vs. lactulosa era superior en pacientes cirróticos hospitalizados por EH aguda (186, 187). Sin embargo, hacen falta nuevos estudios para evaluar la eficacia de este tratamiento.

- **Antibióticos.** La rifaximina es un antibiótico no absorbible que no genera resistencias y que ha demostrado su seguridad y efectividad para prevenir los episodios y la recurrencia de EH, así como el número de ingresos hospitalarios y su duración cuando es administrada sola o en combinación con lactulosa (99, 188, 189).

- **L-ornitina L-aspartato (LOLA).** Estas moléculas sirven como sustrato para el ciclo de la urea en los hepatocitos periportales. Además, pueden activar la producción de glutamina en los hepatocitos pericentrales y en el músculo esquelético conllevando todos estos procesos, la eliminación de amonio. A pesar de que ciertos estudios muestran una mejora en la recurrencia de EH, en algunas ocasiones los pacientes presentan efecto rebote en los niveles de amonio al cesar el tratamiento, por lo que hacen falta más datos para determinar la duración y dosis de esta terapia (190-192). Más aun, este producto no se comercializa en algunos países, España entre ellos.

- **Ornitina fenilacetato.** Este tratamiento está enfocado en la formación de glutamato y la eliminación de glutamina, como mediador en los niveles de amonio (193). Este fármaco se encuentra aún en ensayos fase II (<https://clinicaltrials.gov>).

- **Albúmina y diálisis.** La administración de albúmina podría mejorar la acumulación de especies reactivas de oxígeno gracias a sus propiedades antioxidantes. Diversos estudios han demostrado que en ciertos casos prolonga la supervivencia, aunque no es eficaz a la hora de resolver o prevenir el episodio de EH, los niveles de amonio, marcadores de estrés oxidativo, etc. (194-196). No obstante, a través del uso del sistema MARS (del inglés, *Molecular Adsorbent Recirculating System*) se ha conseguido obtener una mejoría más rápida que en pacientes que no utilizaron este dispositivo (197).

- **Probióticos.** Numerosos estudios han mostrado que, a través de la modulación del microambiente, el tratamiento con probióticos da forma a una microbiota que produce menos amonio y, por tanto,

los pacientes mejoran en la severidad de los eventos. Sin embargo, la alta variabilidad en los tipos y composición de los probióticos así como la falta de validación de estos estudios hacen que su uso aún no sea recomendado (198). Recientemente, un ensayo clínico fase I ha demostrado que el trasplante de microbiota fecal es seguro y bien tolerado, a la vez que mejora la diversidad de la mucosa duodenal y la disbiosis. Los autores lo asocian a una reducción en la translocación bacteriana y a una disminución del riesgo de EH medido mediante el rendimiento en *EncephalApp* (199).

Como se ha esbozado a lo largo de estas líneas, se están llevando a cabo grandes esfuerzos en la investigación del tratamiento de la EH. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos están dirigidos a prevenir la recurrencia (profilaxis secundaria) y son, a día de hoy, escasas las evidencias en la profilaxis primaria, posiblemente debido a gran variedad de eventos que pueden precipitarla, y la dificultad que esto supone. No obstante, se da por hecho que cualquier intervención sobre la cirrosis, más aún si tiene un impacto sobre la función hepática del paciente, también impactará sobre la probabilidad de desarrollo de las complicaciones. De cualquier manera, el pronóstico tras un primer episodio de EH es pobre, por lo que la predicción del riesgo se antoja esencial, más aún si hablamos en términos de riesgo individual, ya que permitiría actuar de manera personalizada en cada paciente.

1.3 Genética

Cada ser humano es único; el ambiente que nos rodea y las experiencias que vivimos nos dan forma, pero también estamos definidos

por las secuencias de ADN específicas que hemos heredado. Durante las últimas décadas hemos sido testigos de una explosión de datos en el campo de la genética humana los cuales, además de acrecentar nuestro entendimiento sobre los patrones de diversidad entre individuos y poblaciones, han posibilitado avances biomédicos de relevancia. En este sentido, se ha demostrado que grandes eventos demográficos dejan una huella sobre la diversidad genética poblacional; incrementos aislados en el tamaño poblacional aumentan la diversidad mientras que los eventos migratorios entre poblaciones favorecen la semejanza genética. Así las cosas, se ha estimado que hoy día dos personas difieren, de media, en 1 de cada 1000 pares de bases de ADN (0,1%). Teniendo en cuenta que los humanos tenemos aproximadamente 3.000 millones de pares de bases en una célula haploide, podríamos asumir que dos personas cualesquiera presentarían diferencias en hasta 3 millones de pares de bases.

En este contexto, el término mutación hace referencia a un “cambio permanente en la estructura del ADN” (www.genome.gov/glossary) que, desde hace años, se viene asociando con la percepción negativa de ser causante de una enfermedad. Contrariamente, el término polimorfismo se usa en ocasiones para referirse a cambios en la secuencia del ADN presentes en la población en una frecuencia mayor al 1%. Nada más lejos de la realidad, cualquier cambio presente en el ADN implica un evento mutacional *de novo* en la línea germinal de un único individuo y, además, puede haber eventos raros descritos como mutaciones que causen una enfermedad, pero ser relativamente frecuentes en la población. Más aún, se da el caso de cambios denominados como polimorfismos que tienen una frecuencia baja y juegan un papel importante en enfermedades de origen multifactorial. Por ello, haremos uso del concepto “variante en la secuencia

de ADN” a lo largo de este texto cuando nos refiramos a cambios específicos o a diversidad, ya que no podemos concluir que ninguno de estos términos lleve implícita una asociación con la presencia de enfermedad o con una frecuencia determinada en población alguna.

Hasta la fecha, se han descrito alrededor de tres mil variantes que contribuyen de alguna manera a la patogenia de enfermedades con alta penetrancia en los humanos. En muchas ocasiones, los esfuerzos en revelar las bases genéticas de condiciones raras han tenido éxito debido a la falta de complejidad genética de las enfermedades monogénicas respecto de otras afecciones más complejas. En las enfermedades raras, una única mutación, a veces en cualquiera de los genes implicados en una cascada de señalización proteica, enzimática o metabólica, que se hereda de manera simple en familias afectadas a través de generaciones, es suficiente para causar la condición. Por el contrario, enfermedades con una herencia multifactorial compleja, como podrían ser la diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurológicas e incluso la mayoría de los tipos de cáncer, aparecen cuando se produce una interacción favorable de numerosos factores genéticos y ambientales (200, 201). Gracias al rápido avance tecnológico en el campo de la genómica, podemos abordar hoy en día el análisis para evaluar la contribución de las variantes genéticas en enfermedades complejas, usando estrategias que pueden ir desde estudios de asociación de genoma completo hasta las últimas tecnologías de secuenciación de nueva generación.

1.3.1 Diversidad a lo largo del genoma

Como se ha esbozado anteriormente, la diversidad genómica puede venir dada a través de cambios en la secuencia como deleciones o

inserciones (indels), sustituciones o duplicaciones, o bien por cambios estructurales que resulten en cambios posicionales, como por ejemplo translocaciones o inversiones (202). Estos cambios pueden a su vez clasificarse según el tamaño del fragmento que implican, dando lugar a variaciones estructurales microscópicas (cambios de tamaño mayor a 3Mb, produciendo alteraciones cromosomales visibles bajo el microscopio) y submicroscópicas (Tabla 6) (203). Entre estas últimas podemos encontrar polimorfismos de un solo nucleótido, microsatélites o minisatélites.

Tabla 6. *Tipos de variación genómica. Modificado de Sherer et al., 2007.*

Variaciones en la secuencia	Variaciones estructurales	
Un solo nucleótido <ul style="list-style-type: none"> • Sustituciones • Inserciones • Deleciones] Indels	2 pb a 1000 pb <ul style="list-style-type: none"> • VNTRs (micro-minisatélites) • Indels • Inversiones 	1kb a submicroscópico <ul style="list-style-type: none"> • Variaciones en número de copias • Microdeleciones-duplicaciones • Inversiones, translocaciones
	Microscópico a subcromosómico <ul style="list-style-type: none"> • Heteromorfismos • Inversiones, deleciones o inserciones cromosómicas • Aneusomía segmentaria • Sitios frágiles • Anomalías cromosómicas 	Cromosómico a genoma completo <ul style="list-style-type: none"> • Translocaciones intercromosoma • Cromosomas en anillo, isocromosomas • Cromosoma marcador • Aneuploidía • Aneusomía

1.3.1.1 Microsatélites y minisatélites

Los microsatélites o STRPs (del inglés, *short tandem repeat polymorphisms*) son un tipo de polimorfismo que consiste en repeticiones de una secuencia patrón de entre dos y cuatro pares de bases un número variable de veces (de dos a varias decenas). Esto hace que el número de alelos para cada *locus* no sea constante (204). Se conocen ya varios miles de regiones que contienen estas variaciones y, aunque son muy útiles como marcadores para identificar individuos en medicina forense, en raras ocasiones se han podido asociar con la presencia de una enfermedad (205).

Por su parte, los minisatélites o VNTR (del inglés, *variable number tandem repeats*) están formados por secuencia de entre diez y cien pares de bases que se repite un mayor número de veces (a veces en múltiplos de 10^2 o 10^3) (206).

1.3.1.2 Polimorfismos de un solo nucleótido

Estas variantes, llamadas frecuentemente SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphisms*) son las más comunes y presentan, en casi todos los casos, dos alelos para cada locus. Los SNPs pueden encontrarse en una región de ADN codificante y resultar en un cambio de aminoácido y en la producción de una proteína alterada, o bien encontrarse en una región reguladora y afectar a la expresión de la misma, siendo en ambos casos considerados como funcionales. Por otro lado, numerosas variantes ocurren en regiones de ADN no codificante o no resultan en cambio aminoacídico debido a la naturaleza redundante del código genético. No obstante, pueden también encontrarse asociadas a un determinado fenotipo debido a la cercanía y baja probabilidad de eventos recombinatorios (desequilibrio de ligamiento) con una variante funcional, siendo en algunas ocasiones idóneas para ser usadas como marcadores genéticos en estudios poblacionales. A pesar de que el impacto de los marcadores genéticos en la práctica clínica sigue siendo, en muchas ocasiones, limitado, se ha demostrado que determinados SNPs podrían explicar las variaciones inter-individuo en la progresión o respuesta terapéutica ante distintas enfermedades (Figura 1). Además, estos descubrimientos han supuesto un gran avance en el camino hacia la medicina personalizada: partiendo de la caracterización de los procesos fisiopatológicos hasta la identificación de nuevas dianas, factores

de riesgo o incluso ayudar en la reclasificación de ciertas enfermedades (207).

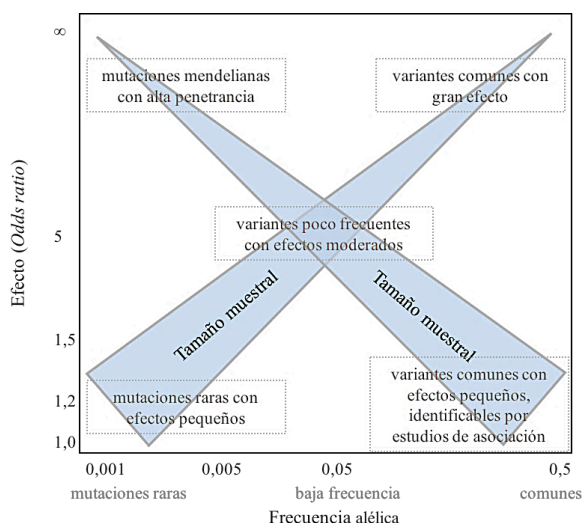


Figura 1. Espectro de los efectos de los alelos asociados con un rasgo. Las enfermedades Mendelianas se producen por variantes con alta penetrancia y gran efecto, por lo que pueden ser identificadas con pequeños tamaños muestrales. Los estudios de asociación pueden identificar variantes comunes, pero, en término general, a menor efecto, mayor tamaño muestral.

Respecto de las enfermedades hepáticas, las diferencias en la susceptibilidad a la fibrosis y a su progresión se han demostrado independientes de la etiología, edad o sexo, poniendo de manifiesto la relevancia de posibles factores genéticos que subyazcan a esta variabilidad (208). Tal es el caso de SNPs como rs17047200 en la región de influencia de *TLL1* o rs641738 en *MBOAT7* en pacientes con hepatitis crónica C (209, 210). En el caso de la hepatitis C además, la baja tasa de respuesta viral sostenida alcanzada con el tratamiento basado en la combinación de interferón pegilado y ribavirina, realzó la necesidad de buscar posibles

características en el hospedador que permitieran predecir la respuesta. A través de estudios de asociación de genoma completo se identificaron variantes en la región *INFL4/INFL3* que podían ayudar a predecir la respuesta a la terapia y que estaban, además, asociados con el aclaramiento viral espontáneo y el riesgo de fibrosis (211, 212). Otro caso de relevancia ha sido la variante rs738409 en la región codificante de *PNPLA3*, que se ha asociado con un riesgo incrementado de tres veces para esteatohepatitis no alcohólica, dos veces para cirrosis por alcohol y hasta doce veces para carcinoma hepatocelular (213, 214). Respecto de las complicaciones de la cirrosis, fueron Appenrodt *et al.* los primeros en demostrar una asociación entre ciertas variantes en *NOD2* y la predisposición a peritonitis bacteriana espontánea, así como sobre el impacto en la supervivencia (215). Más tarde se encontró también una asociación de esta variante con el riesgo de sangrado por varices y cáncer, sirviendo todos estos hallazgos para llevar a cabo un ensayo con el objetivo de mejorar la supervivencia mediante profilaxis con antibióticos en pacientes cirróticos en alto riesgo, definiendo este por los marcadores genéticos (216, 217).

A modo de resumen, podemos decir que la mayoría de desórdenes hepáticos están influenciados por múltiples genes y por interacciones intergénicas. La identificación de estos genes se ve en muchos casos complicada debido a efectos epistáticos o factores exógenos. Sin embargo, hasta la fecha muy pocos estudios han analizado la asociación de múltiples genes como factores de riesgo de manera simultánea.

1.3.2 Estudios de asociación vs. ligamiento

Hace más de un siglo, Sir R. Fisher demostró que cualquier rasgo cuantitativo complejo podría explicarse siguiendo las leyes de herencia

Mendeliana dado el caso de que varios genes afectaran a dicho rasgo. En aquellos rasgos cualitativos estudiados por Mendel, los alelos se comportaban siguiendo patrones de dominancia completa; así, un simple *locus* con dos alelos de igual frecuencia resultaba en tres genotipos, pero solo dos fenotipos distintos. Sin embargo, si se asume el efecto aditivo de los alelos, un *locus* produciría tres genotipos y tres fenotipos, dos *loci* nueve genotipos y 5 fenotipos y tres *loci*, veintisiete y siete, respectivamente. De esta manera, se propuso que rasgos cuantitativos complejos podrían tener una naturaleza poligénica y, por lo tanto, a través de estudios de asociación genética se podrían identificar variantes (generalmente se interrogan SNPs, pero también microsatélites, indels, VTNRs o incluso variaciones en el número de copias) relacionadas con la aparición de estos rasgos (218).

Desde hace varias décadas, el análisis de ligamiento ha servido para identificar genes y variantes específicas responsables de enfermedades raras que se basan en un patrón de herencia mendeliana con alta penetrancia (219). Este tipo de estudios se fundamenta en el fenómeno de cosegregación de un fenotipo, determinando así si un alelo se hereda de manera conjunta a la enfermedad a lo largo de las generaciones. Sin embargo, en enfermedades poligénicas no existe normalmente un patrón de herencia claro dentro de un pedigrí, por lo que estas aproximaciones no siempre aportan información en estas situaciones (con alguna excepción, como la susceptibilidad a enfermedad de Crohn (220, 221)).

Los estudios de asociación se basan en la suposición de que las variantes relacionadas serán más frecuentes en los individuos afectados que en los controles, asumiendo que los casos comparten un genotipo por el hecho de compartir un fenotipo. Una asociación estadísticamente significativa podría deberse a una asociación directa, en la cual los

marcadores son los causantes de la enfermedad, o ser reflejo del desequilibrio de ligamiento con una variante cercana. Una de las fortalezas de estos estudios es la capacidad de detectar marcadores con efectos discretos sobre la prevalencia de la enfermedad, lo que conlleva que los resultados de estos análisis tengan en ocasiones bajas *odds ratios* (222). No obstante, las debilidades inherentes a estos estudios hacen que sea difícil encontrar hallazgos positivos significativos y dificultan la replicación. Por lo tanto, se ha descrito que mientras que los estudios de asociación pueden detectar alelos que confieran una mayor susceptibilidad a la enfermedad, en rasgos multifactoriales en los que puede haber implicados muchos genes y múltiples variantes, la magnitud del riesgo individual otorgada por cada variante sería modesta, no siendo suficientes ni necesarias para la aparición del rasgo (223). Así, mientras que la relevancia del análisis de múltiples variantes en una región concreta es discutible (y la determinación de los patrones de desequilibrio de ligamiento dentro de esa región, esencial), el análisis de múltiples marcadores a lo largo del genoma aporta una valiosa información, permitiendo identificar la interacción entre genes en el riesgo a desarrollar la enfermedad. Por todo ello, los estudios de asociación usando una aproximación de genes candidatos basados en la plausibilidad biológica han sido ampliamente utilizados en numerosas situaciones para las cuales había evidencias que soportaban un papel importante de los factores genéticos.

1.3.3 Evidencias en encefalopatía hepática

En el contexto de la EH, tal y como se ha expuesto anteriormente, se han encontrado una serie de evidencias que soportan la hipótesis de que ciertos factores genéticos pueden influir en las diferencias en la

presentación de EH en pacientes con cirrosis. En este sentido, se ha descrito que individuos con el mismo grado de cirrosis y la presencia de factores desencadenantes idénticos pueden desarrollar, o no, EH. Por otro lado, es sabido que presentar un deterioro cognitivo discreto en forma de EH mínima predispone al desarrollo de episodios de EH. Sin embargo, se ha calculado que aproximadamente el 40% de los pacientes cirróticos con EH mínima no desarrollarán EH durante el seguimiento a largo plazo (61).

En este contexto, publicaciones previas nos llevan a pensar que diferencias en la expresión o actividad de ciertas proteínas debido a factores genéticos, tendrían una influencia en la captación, movilización y metabolismo de la glutamina, ligada a la producción de amonio, así como en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, teniendo como resultado diferencias en la respuesta inflamatoria, asociada al desarrollo de EH. Por ejemplo, Guarner-Argente *et al.*, demostraron que cirróticos portadores de un genotipo de riesgo en el gen *TLR4* tenían con mayor frecuencia HE como primer evento de descompensación que los que portaban el *wild-type* (224). Además, años más tarde publicaron que, aunque no se asoció con el riesgo de infecciones bacterianas en pacientes con ascitis, este polimorfismo se asociaba con un patrón de producción de citoquinas distinto, el cual podría jugar un papel en el desarrollo de complicaciones de la cirrosis (225, 226). Otro estudio reportó que los pacientes con EH tras intoxicación por acetaminofén portaban un genotipo del gen *TNF β* con frecuencia menor que los controles (227). Años más tarde, Romero-Gómez *et al.*, identificaron un microsatélite en la región promotora de *GLS* formado por número variable de repeticiones de tres nucleótidos (GCA), el cual asociaron a una mayor expresión del gen y, con ello, a un mayor riesgo de desarrollar eventos de EH (228). En este mismo trabajo, analizaron la presencia de un haplotipo

formado por cuatro SNPs en función del riesgo a desarrollar EH, sugiriendo la presencia de al menos una variante funcional cercana al gen *GLS*, con resultados igualmente significativos. En comparación con el haplotipo TGTG (el más común en el estudio), el haplotipo TACC se asoció con la ausencia de EH [OR 0,34 (0,13-0,90); $p=0,03$].

2 HIPÓTESIS

La encefalopatía hepática es una complicación mayor de la cirrosis hepática de fisiopatología compleja y multifactorial, pudiendo estar influenciada por múltiples genes e interacciones intergénicas, así como por el exposoma (ambiente y/o estilo de vida) o efectos epistáticos.

Evidencias recientes avalan la hipótesis de que la carga genética puede jugar un papel relevante en las diferencias que observamos en la presentación de la enfermedad. Así, se ha observado que pacientes con el mismo grado de disfunción hepática y los mismos factores precipitantes pueden desarrollar, o no, encefalopatía hepática.

La hipótesis de la presente tesis doctoral radica en que un estudio de asociación que examine variantes en genes candidatos permitirá encontrar una huella genética que pudiera modular el riesgo de desarrollar EH en pacientes con cirrosis hepática. Las variantes podrían explicar, al menos en parte, las diferencias clínicas que se observan en su presentación. Además, estos marcadores genéticos nos permitirán clasificar a los pacientes en función del riesgo de desarrollar episodios de encefalopatía hepática, e identificar dianas terapéuticas que puedan ser útiles en el proceso de toma de decisiones.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

- Desarrollar un modelo predictivo de aparición de encefalopatía hepática y supervivencia basado en los métodos diagnósticos de EH mínima, factores genéticos y características clínicas del paciente.

3.2 Objetivos secundarios

- Determinar los factores genéticos asociados a riesgo aumentado de EH.

- Identificar nuevas dianas terapéuticas asociadas a los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad.

- Determinar la efectividad de la plataforma de genotipado de alto rendimiento.

4 MÉTODOS

4.1 Sujetos de estudio

Durante el periodo comprendido entre los años 2003 y 2013 se invitó a participar en el estudio a todos los pacientes diagnosticados de cirrosis hepática compensada seguidos en las consultas externas del Hospital de Valme (Sevilla, España), del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España) y del Hospital General Universitario de Alicante (Alicante, España). Una vez informados, todos los participantes dieron su consentimiento por escrito. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital. El estudio se desarrolló siguiendo los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos adoptados por la 18ª Asamblea Médica Mundial en la Declaración de Helsinki (Finlandia, 1964), en su actualización más reciente (62ª Asamblea General, Brasil, 2013). Asimismo, para el procesado de muestras y datos se siguieron las recomendaciones recogidas en las guías E18 (*Guideline on genomic sampling and management of genomic data*) y E6 (*Guideline for good clinical practice*) del *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*.

Los criterios de inclusión para la participación en el estudio fueron:

- a) Pacientes adultos (>18 años).
- b) Diagnosticados de cirrosis hepática.
- c) Firmar el consentimiento informado.

Los criterios de exclusión del estudio fueron los siguientes:

- a) Edad <18 años.
- b) Haber recibido un trasplante hepático previamente.
- c) Diagnóstico de hepatocarcinoma previo.
- d) Insuficiencia hepática avanzada (índice Child-Pugh C).

- e) Consumo activo de alcohol.
- f) TIPS previo.
- g) Clínica de EH (escala de West-Haven ≥ 1).
- h) Coexistencia de cualquier otra enfermedad con una supervivencia estimada inferior a seis meses.
- i) Seguimiento inferior a seis meses.
- j) Para impedir la posibilidad de que algunos individuos compartieran genotipo por algún tipo de apareamiento selectivo (endogamia), se evitó la inclusión de individuos relacionados familiarmente entre sí.

4.1.1 Tamaño muestral

Estudio de cohortes retrospectivo de pacientes reclutados prospectivamente. Debido a la naturaleza del estudio, en el cual se estudian múltiples *loci*, el cálculo del tamaño muestral se antoja complejo. Al realizar una comparativa entre dos poblaciones, en este estudio, casos y controles, debemos evitar en la medida de lo posible la generación de falsos positivos debido a un escaso poder estadístico (error Tipo II). No obstante, podemos decir que (utilizando la *Genetic Association Study (GAS) Power Calculator*), para una cohorte en la que la relación control:caso es aproximadamente 2:1 en un total de 301 pacientes, una prevalencia estimada de la enfermedad del 33%, una frecuencia media del alelo causante de 0,2, un riesgo relativo para los portadores del genotipo de 2, y un nivel de significancia de 0,05, el poder del estudio sería superior al 95% si tuviéramos en cuenta todos los posibles modelos de herencia (a excepción del recesivo, cuyo poder no superaría el 30%) (Figura 2). Según lo discutido en publicaciones previas, serían asumibles valores de fortaleza del estudio

>80%, los cuales se superarían incluso si el marcador en estudio tuviera una frecuencia menor u otorgase un riesgo relativo inferior (229).

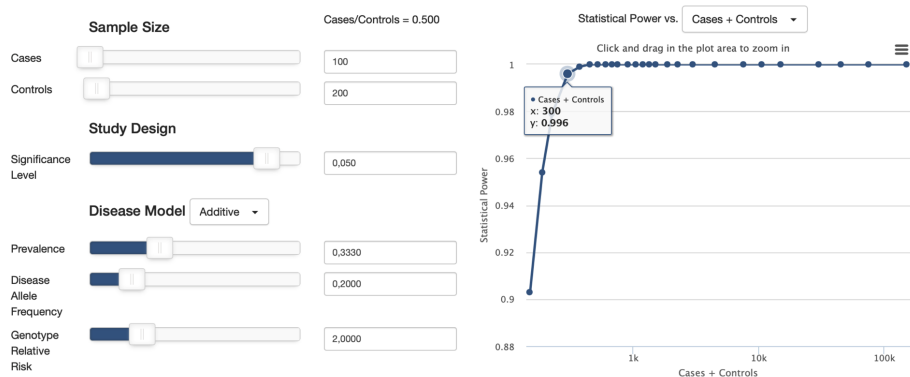


Figura 2. Imagen representativa del proceso de estimación del tamaño muestral y poder estadístico.

4.1.2 Recogida de datos

Los pacientes diagnosticados de cirrosis hepática atendidos en consultas de forma rutinaria se sometieron a pruebas analíticas y de imagen incluyendo valoración de la función hepática, presencia de hipertensión portal y despistaje de hepatocarcinoma según la práctica clínica habitual. Se revisó su historial médico y se recogieron datos clínicos, demográficos y epidemiológicos. Los pacientes fueron seguidos cada seis meses siendo censurados en el momento de la última visita registrada, fallecimiento, trasplante hepático o presencia de un episodio de EH hasta un tiempo máximo de 60 meses.

Las variables registradas fueron las siguientes: datos demográficos (edad y género), etiología de la cirrosis, comorbilidades, éxitus (fecha y

causa), cálculo de los índices de función hepática (Child-Pugh y MELD), descompensaciones (fecha, grado y causa si procediera), tratamientos y parámetros de laboratorio tales como: albúmina, bilirrubina, plaquetas, AST, ALT, sodio, INR, creatinina y leucocitos.

4.1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de cirrosis hepática se basó los siguientes criterios: clínicos (presencia de hipertensión portal, disfunción hepática o presencia previa de sangrado por varices o ascitis), histológicos (biopsia hepática o laparoscopia), radiológicos (dilatación de la vena porta, esplenomegalia) y criterios bioquímicos que incluyen los parámetros utilizados para calcular los índices Child-Pugh y MELD.

La detección de EHM se llevó a cabo mediante la evaluación de las pruebas PHES y CFF (Hepatonorm Analyzer, nevoLAB GmbH, D-88167 Maierhöfen, Alemania), de acuerdo a las guías de las asociaciones EASL y AASLD. Además, un subgrupo de pacientes se realizó también la sobrecarga oral de glutamina. De manera resumida:

PHES. Esta prueba consiste en una batería de cinco test psicométricos diseñados para el diagnóstico de EH mínima (Figura 3). Previamente a la realización de esta prueba y, tras informar a los pacientes, el operador realizó una serie de comprobaciones de manera sistemática:

- El paciente estaba cómodamente sentado, frente a una mesa con la iluminación adecuada, con la temperatura controlada y la puerta cerrada para evitar interrupciones.

- Si el paciente usaba gafas, se aseguró de que las llevara durante todo el tiempo que durase la prueba para corregir defectos de refracción.

- Utilizar una hoja original para la prueba, comprobando que estaba correctamente orientada y que era fácilmente legible. Así mismo, se usó un rotulador edding® 1200, comprobando que escribía bien, y teniendo uno de repuesto a mano. El tiempo se midió utilizando un cronómetro, a fin de asegurar una correcta lectura e interpretación del mismo.

El paciente comprendió las instrucciones de cada test, que fueron leídas tantas veces como fue necesario, y realizó las pruebas de entrenamiento de manera correcta.

Test de símbolos y números. Consiste en convertir distintos símbolos en números a partir de una clave preestablecida. Se cuentan los símbolos correctamente rellenos en el plazo de 90 segundos.

Test de Conexión Numérica A (TCN A). La realización de este test consiste en unir los números del 1 al 25, que están aleatoriamente colocados, sucesivamente en orden creciente. Se cuantifica el tiempo que se tarda en hacerlo de manera correcta.

Test de Conexión Numérica B (TCN B). En esta hoja hay números, del 1 al 13, y letras de la A a la L, que se deben conectar de manera alterna, tan rápido como sea posible. Esto es, el 1 a la A, el 2 a la B, y así sucesivamente. Se anota el tiempo que se tarda en hacerlo de manera correcta.

TEST DE SÍMBOLOS Y NÚMEROS

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/di): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 PUNTAJACIÓN: _____

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Δ	□	▽	○	△	◇	◊	◑	◒

→

2	1	3	1	4	2	1	3	5	3	2	1	4	2	1	3	1	2	4	1
□	Δ	▽	○	△	◇	◊	◑	◒											

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Δ	□	▽	○	△	◇	◊	◑	◒

2	1	3	1	2	1	3	1	4	2	4	2	5	1	4	3	5	3	6	2
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1	6	5	2	4	7	3	5	1	7	6	3	8	5	3	6	4	2	1	8
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

9	2	7	6	3	5	8	3	6	5	4	9	7	1	8	5	6	8	2
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

7	1	9	3	8	2	5	7	4	1	6	7	4	5	8	2	9	6	4	3
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

TEST DE CONEXIÓN NUMÉRICA A

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/di): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 TIEMPO: _____ segundos PUNTAJACIÓN: _____

TEST DE CONEXIÓN NUMÉRICA B

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/di): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 TIEMPO: _____ segundos PUNTAJACIÓN: _____

SERIE DE PUNTOS

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/di): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 TIEMPO: _____ segundos

TEST DE LA LÍNEA QUEBRADA

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/di): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 TIEMPO: _____ segundos PUNTAJACIÓN: _____

Figura 3. Imagen de los cinco test que componen la prueba PHES.

Test de Serie de Puntos (SD). Esta prueba consiste en hacer un punto en el centro de unos círculos, empezando siempre por la parte izquierda de la fila. Se recoge el tiempo empleado en completar la hoja.

Test de Trazado de Líneas (LT). En este test, el paciente debe dibujar una línea continua dentro de los límites establecidos, sin tocar ni cruzar estos límites y sin levantar el rotulador del papel. Se anotan tanto el tiempo necesitado para acabar la línea, como el número de errores cometidos.

Finalmente, las hojas se corrigen otorgando puntos positivos o negativos en base a la desviación de cada hoja respecto de los resultados estandarizados (disponibles en www.redeh.org), obteniendo una puntuación que puede oscilar entre -15 y 3 puntos. Según publicaciones previas, una puntuación por debajo de -4 fue considerada patológica (230).

FCP. La frecuencia crítica del parpadeo consiste en la colocación de unas gafas cerradas sobre el campo visual del paciente, el cual observa una luz parpadeante a una frecuencia tal que es percibida como una luz fija (60 Hz). En el momento del inicio de la prueba, y de manera progresiva, la frecuencia de parpadeo va disminuyendo hasta que el paciente consigue percibir una luz intermitente, momento en el que presiona un botón, y se registra la frecuencia. Tras cinco mediciones de prueba, como entrenamiento para el paciente, el proceso se repitió diez ocasiones, y se calculó el resultado final como la media de todos los intentos. Valores de frecuencia inferiores a 39 Hz se consideraron patológicos.

SOG. Una vez informados los pacientes, se realizó una extracción de sangre venosa en ayunas, a nivel basal. Posteriormente, se administraron 10 gramos de glutamina (L-Glutamine, SHS S.A., España) diluida en 100 mL de agua. 60 minutos después se realizó una segunda extracción de sangre. Las muestras se obtuvieron por venopunción en tubos de EDTA tripotásico, evitando la hemólisis. Fueron centrifugadas y mantenidas en hielo hasta la determinación de amonio, siempre en el plazo de 20 minutos. La determinación se llevó a cabo siguiendo un método enzimático en el sistema Cobas C (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Teniendo en cuenta los datos de un estudio previo, se consideraron patológicos valores basales superiores

o iguales a 79 $\mu\text{g/dL}$ o valores del incremento ($\Delta = [\text{amonio a 60 minutos}] - [\text{amonio basal}]$) superiores o iguales a 33 $\mu\text{g/dL}$ (84).

Estas pruebas fueron realizadas en la Consulta de Enfermería en condiciones de confortabilidad por un operador experto (el mismo para las distintas pruebas) coincidiendo con la fecha de la toma de las muestras. El diagnóstico de EH previa o durante el seguimiento fue llevado a cabo siguiendo los criterios de West-Haven (anteriormente descritos) y recogido en la base de datos.

4.2 Muestras

En el momento del inicio en el estudio, durante la primera visita, a cada paciente se le extrajo una muestra de sangre venosa periférica en tubos de 4 mL estériles con EDTA tripotásico como anticoagulante (1 mg/mL). En el transcurso de las 4 horas posteriores a la extracción, la muestra fue alicuotada en criotubos roscados de 1,8 mL usando pipetas estériles y libres de nucleasas, etiquetada y conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del procesado, previniendo así una reducción en la concentración e integridad del ADN. Una vez anonimizados los pacientes, e independientemente de la etiología, todas las muestras fueron tratadas como potencialmente infecciosas.

4.2.1 Extracción y purificación de ADN

El ADN de cada paciente se extrajo de la muestra de sangre total de forma automatizada en el sistema *MagNa Pure Compact* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) utilizando el *MagNa Pure*

Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, según las instrucciones del fabricante. Brevemente:

- 400 μL * de sangre, previamente descongelada de manera gradual, y una vez atemperada, fueron alicuotados en los tubos de recogida, evitando la formación de burbujas (* el fabricante recomienda usar volúmenes inferiores siempre y cuando la muestra tenga una concentración celular $> 5 \times 10^3$ células/ μL . No obstante, experiencia previa con este tipo de muestras ha demostrado que el uso de 400 μL resulta en una eficiencia óptima en la mayoría de los casos). Una vez insertados todos los cartuchos de reactivos y tubos en el sistema, se seleccionó el programa DNA_Blood_100_400. En un primer paso, la muestra fue sometida a una digestión con proteinasa K. Posteriormente la muestra se lisó en un tampón conteniendo el agente caotrópico GITC, tras lo cual el ADN se unió de manera específica a pequeñas partículas magnéticas de cristal, separándolo del resto de biomoléculas. Finalmente, y tras varios lavados con distintos tampones, se recogieron 100 μL de ADN disuelto en tampón de elución en tubos de 2 mL.

A pesar de que en algunas condiciones el rendimiento de la extracción tradicional sea mayor, el uso de este método automatizado permitió reducir tanto el tiempo de procesado como la exposición del operador a sustancias potencialmente tóxicas. Además, con este método se consiguió una mayor integridad de las moléculas de ADN y una menor presencia de contaminantes que pudieran inhibir las reacciones de PCR, consiguiendo una mayor precisión y reproducibilidad en los resultados.

4.2.2 Cuantificación del ADN

Una vez obtenido el material genético, se determinó el rendimiento de la extracción a través de la concentración obtenida. Siguiendo la ley de Beer-Lambert, que indica que la concentración de una molécula en solución es proporcional a la cantidad de luz absorbida por las moléculas disueltas, y aprovechando que el ADN puede absorber luz en el rango ultravioleta (260 nm), se estimó la concentración de cada muestra por espectrofotometría usando el Nanodrop One (ThermoFisher, CA, EEUU). El coeficiente de extinción aplicado al cálculo fue de 50 ng-cm/ μ L. De manera similar, la pureza de cada muestra se valoró teniendo en cuenta las relaciones de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm. Una proporción de 1,8 en la primera fue aceptada como ADN de alta pureza, mientras que valores inferiores indicaron la presencia de proteínas. Como segunda medida de pureza se usó la proporción 260/230 nm; valores en el rango de 1,8-2,2 se consideraron como ADN puro y valores inferiores se tuvieron en cuenta como indicativos de la presencia de contaminantes.

4.3 Estudio de genes candidatos

4.3.1 Nomenclatura

El nombre y símbolo de los genes referidos en este trabajo se fundamentan en la última actualización de la base de datos del *Hugo Gene Nomenclature Committee* (por sus siglas, en inglés: HGNC) (231). La descripción de las variantes se basa en las recomendaciones actuales de la *Human Genome Variation Society* (HGVS), en su versión 15.11 (232), siendo comprobadas a través de la aplicación web *Mutalyzer* v.2.0.26 (disponible en www.mutalyzer.nl) y en referencia a las secuencias de la construcción genómica GRCh38.p7 y/o las presentes en *Locus Reference*

Genomic (disponible en <http://www.lrg-sequence.org>) en caso de ambigüedad (233). Cada variante dentro de un mismo *locus* será referida como alelo, que será considerado mayor o menor en función de su frecuencia en la población en estudio. La pareja de alelos observada en un individuo concreto será denominada genotipo, que podrá a su vez ser homocigoto si los dos alelos presentados son idénticos o heterocigoto si los alelos son diferentes.

Las proteínas se nombran en base a las recomendaciones que aparecen en el *Universal Protein Resource* (www.uniprot.org), enzimas siguiendo el código ENZYME de ExPASy (<https://enzyme.expasy.org>) mientras que las funciones biológicas y moleculares se expresan siguiendo las anotaciones del *Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>).

4.3.2 Selección de genes candidatos

Los genes susceptibles de ser interrogados fueron seleccionados en base a los conocimientos previamente disponibles de su relación con procesos biológicos, fisiológicos o funcionales en el contexto de la cirrosis o la EH. Esto se consiguió en primer lugar haciendo *data mining* en la literatura a través de búsquedas en las bases de datos MEDLINE, Embase y Google Scholar usando términos MeSH (del inglés, *Medical Subject Headings*). Posteriormente, se generaron varias listas de genes relevantes usando: 1) la plataforma SNPs3D (<http://www.snps3d.org>) (234), donde se introdujeron las mismas palabras clave MeSH, y 2) examinando rutas biológicas relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad en PANTHER v.9,0 (<http://pantherdb.org>), resultando en listas de genes con una asociación ontológica dada. Finalmente, estas listas fueron sometidas a priorización usando el servidor web Endeavour

(<https://endeavour.esat.kuleuven.be>). Los genes fueron seleccionados en base a la significancia obtenida y, en última instancia, el número de genes participantes de cada lista se curó de manera manual en base al nivel de evidencia en la literatura de cada ruta en la fisiopatología de la enfermedad.

4.3.3 Selección de SNPs candidatos

Se incluyeron únicamente variantes comunes, definidas como aquellas que tuvieron una frecuencia alélica menor (MAF) superior al 1% en población CEU (residentes en Utah con ancestros de Europa del norte y oeste) con referencia a las bases de datos HapMap/dbSNP (HapMap versión 23a/*phaseII*, marzo 2008, sobre el ensamblaje de NCBI B36; dbSNP b126), así como en población europea siguiendo la versión 1 de ExAC y/o *Genome aggregation database*. La búsqueda se realizó priorizando en variantes causantes de cambio de sentido, sin sentido e indels. Además, y debido a que en ocasiones estos polimorfismos son raros, se priorizó también la búsqueda en regiones regulatorias. Para capturar variantes raras, se buscaron tag SNPs en cada gen incluyendo hasta 5 kb en las regiones flanqueadoras del ADN 5' y 3' usando las herramientas *Tagger* y *Linkage Disequilibrium Calculator* (<http://ensemble.org>).

Los SNPs también fueron seleccionados en base a la predicción de funcionalidad según *Variant Effect Predictor* (<http://ensemble.org>), así como su significancia clínica según lo reportado en *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). De manera similar, también se buscaron eQTLs (del inglés, *expression Quantitative Trait Loci*) y LD-eQTLs a través de la base de datos ExSNP (235), los cuales proporcionan información de las variantes asociadas a cambios de expresión de genes. Más aún, los eQTLs fueron sondeados en tejidos específicos usando los

datos de GTEx (disponibles en www.gtexportal.org). Finalmente, se analizó la posible situación de las variantes candidatas en regiones putativas de unión de miARNs en los 3'UTR de cada gen usando las herramientas *MirSNP* (<http://bioinfo.bjmu.edu.cn/mirsnp/search/>) y *TargetScan 7.1* (www.targetscan.org) (236) (Figura 4).

Además, también se incluyeron en el análisis los cuatro SNPs asociados al desarrollo de EH en un estudio previo de nuestro grupo, descrito a lo largo de este texto. Estos polimorfismos [NC_000002.12:g.190908462A>G (rs3771310), NC_000002.12:g.190912589A>G (rs6743496), NC_000002.12:g.190923691G> (rs2883713) y NC_000002.12:g.190964686C>G (rs3088307)] fueron seleccionados generando bloques de haplotipos de entre los 162 SNPs descritos en la región 2q32-q34 usando patrones de desequilibrio de ligamiento de acuerdo a los datos de HapMap, gracias a la herramienta *Haploview* (v.4,0; Broad Institute, MA, EEUU). A pesar de que la región completa se encuentra en un alto grado de desequilibrio de ligamiento, se formaron cuatro bloques que cubrían la máxima información posible y se analizaron todas las asociaciones dables basadas en las distintas formaciones de haplotipos entre casos y controles usando el *software Thesias (Testing Haplotype Effects in Association Studies)* (v.3,1; París, Francia). De los 16 haplotipos posibles con estas combinaciones, solo se encontraron 6 en una frecuencia mayor al 1%. En comparación con el haplotipo TGTG (el más común en el estudio), el haplotipo TACC se asoció con la protección frente a EH [OR 0,34 (0,13-0,90); $p=0,03$]. Basándonos en estos resultados previos y, a fin de confirmarlos en esta nueva cohorte, se generó una variable formada por la presencia o ausencia de este haplotipo.

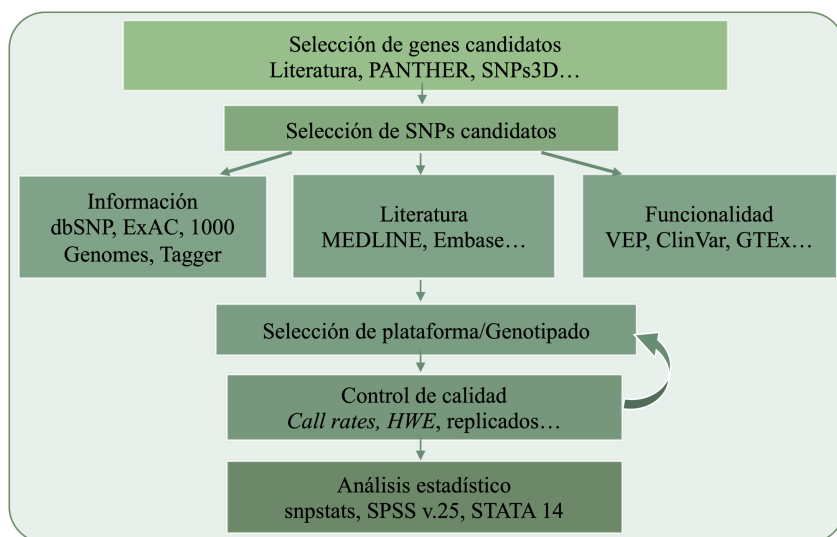


Figura 4. Flujo de trabajo en el proceso de selección y análisis de las variantes.

4.3.4 Genotipado

El genotipado fue llevado a cabo por qPCR usando ensayos TaqMan, los cuales contienen una pareja de cebadores (*forward* y *reverse*) específicos para la secuencia de interés y sondas marcadas con diferentes fluoróforos para cada alelo (6-FAM o VIC), además de un *quencher* no fluorescente unido al extremo 3'. En este tipo de ensayos la discriminación de una única base se lleva a cabo bajo condiciones de competencia, con las dos sondas presentes en la misma reacción, y teniendo en cuenta que el alineamiento por complementariedad de bases de la sonda correcta tendrá una temperatura de fusión mayor que el alineamiento incorrecto el cual, a su vez, es menos estable. No obstante, a pesar de llevar en el extremo 3' elementos de unión al surco menor de la hélice de ADN que estabilizan la hibridación y permiten una ventana de temperatura mayor para la discriminación entre sondas, a medida que progresa el experimento se

observa en ocasiones el efecto *clam shell*. Para disminuir los posibles errores debido a este efecto se usaron en este proyecto aparatos de qPCR que permitieran el rastreo de las muestras a través de los ciclos de temperatura, aumentando así la capacidad de discriminación de *clusters*.

Se utilizaron dos plataformas distintas, a fin de comparar la eficacia entre ellas. Independientemente de la plataforma, cada carrera se llevó a cabo con al menos un 15% de las muestras en duplicado, descartando aquellas con un porcentaje de coincidencia <90% en el total de los marcadores. Las muestras sin amplificación, con discriminación alélica indeterminada o con incoherencia en los duplicados, fueron descartadas o ensayadas de nuevo si el material restante lo permitió.

4.3.4.1 LightCycler 96 Instrument

Esta plataforma permite la discriminación alélica de un SNP a través de la captura de datos de fluorescencia a punto final. No obstante, gracias al parámetro *cycles slider* permite el seguimiento a tiempo real de cada una de las muestras. Mediante el uso del bloque de 96 pocillos se pudo ensayar un SNP en hasta 96 muestras (incluyendo duplicados y al menos 2 NTCs) por cada carrera. Las reacciones se llevaron a cabo cargando en cada pocillo 10 µL de *FastStart Essential DNA Probes Master* (Roche, Basilea, Suiza), 0,5 µL del ensayo TaqMan 40X (ThermoFisher, CA, EEUU), 20 ng de ADN y un volumen variable de agua ultrapura tipo I. Inmediatamente después, la placa fue sellada y centrifugada a 1500 x g durante 2 minutos en una centrífuga de rotor basculante. Las condiciones de la PCR fueron: preincubación a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de amplificación en dos pasos, 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 60 segundos. Los resultados fueron analizados en el *LightCycler 96*

Application Software (Roche, Basilea, Suiza), usando el límite de fluorescencia de los NTCs como valor umbral de la amplificación.

Cuatro variantes fueron genotipadas usando esta plataforma, las correspondientes al haplotipo en *GLS* descrito anteriormente; además del *genotype calling*, se recogieron los datos de *assay call rate*.

4.3.4.2 Plataforma OpenArray

Esta plataforma se basa en el uso de matrices de poros microscópicos de 300 μm de diámetro y 300 μm de profundidad tratados con coberturas hidrofílicas e hidrofóbicas. Así, los reactivos y las muestras son retenidos a través de la fuerza de tensión superficial y se consigue una reacción individual de PCR en cada poro en un volumen mínimo (33 nL). Una matriz de OpenArray contiene 3.072 poros, lo que equivaldría a 8 placas de 384 o 32 de 96 pocillos. Debido al elevado número de muestras y ensayos a analizar, se decidió usar esta tecnología de alto rendimiento, la cual, en combinación con el sistema *QuantStudio 12K Flex* nos permitió obtener hasta ~12.000 datos de genotipado/día con hasta un 99,7% de concordancia en comparación con cualquier sistema *Real-Time PCR* convencional.

La tecnología OpenArray se basa igualmente en la lectura post-PCR de datos de fluorescencia usando ensayos TaqMan. No obstante, gracias al sistema usado pudimos obtener datos en tiempo real. La metodología seguida se detalla a continuación:

- En primer lugar, se hizo el diseño personalizado de las matrices conteniendo los ensayos para los 60 SNPs seleccionados usando la plataforma web.

- El ADN se combinó con la *TaqMan OpenArray Genotyping Master Mix* en una *OpenArray 384-Sample Plate* normalizado a una concentración aproximada de 50 ng/μL (teniendo en cuenta que 1 ng de ADN humano = 300 copias genómicas, esta concentración nos aseguró que al menos 825 pg de ADN estuvieran presentes por cada reacción de 33 nL o, lo que es lo mismo, aproximadamente 250 copias de genoma haploide, 125 copias en el caso de un heterocigoto; gracias a esta regla conseguimos amplificaciones óptimas con valores de Ct cercanos a 25).

- La mezcla se cargó en las matrices usando el sistema automatizado *QuantStudio 12K Flex AccuFill*. Inmediatamente después, para prevenir la evaporación, las matrices fueron selladas y bañadas en líquido de inmersión, evitando la formación de burbujas en el interior de la carcasa.

- Finalmente, el exterior de la matriz fue limpiado usando un paño de laboratorio rociado con etanol y se introdujo en el sistema de qPCR para iniciar las carreras.

Las muestras fueron rastreadas a lo largo de todo el proceso a través de archivos *.csv con la localización e identificación individual de cada una de ellas, tanto en las placas de 96/384 pocillos como en las matrices. Estos archivos fueron generados utilizando el macro *OA_Genotyping_CalcSheet.xlsx* (disponible en: www.thermofisher.com) y, una vez precargados en cada uno de los sistemas usados, aseguraron la trazabilidad y limitaron los errores en el manejo de las muestras. Una vez finalizadas las carreras, se comprobó la calidad de las mismas a través del análisis de imagen de las matrices según la fluorescencia en cada uno de los canales (ROX, VIC y FAM), y cualquier problema en la carga o

procesamiento fue detectado y tenido en cuenta. Las imágenes fueron analizadas usando el *software ImageJ* v.1.50i (disponible en: <https://imagej.nih.gov>) Figura 5.

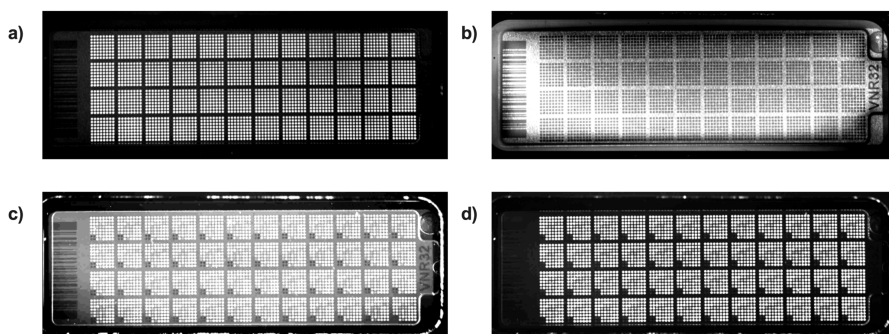













Figura 5. Imagen representativa del análisis de calidad mediante imágenes de: a) *Post-read* ROX, b) *Lead check*, c) *Post-read* FAM y d) *Post-read* VIC.

Aquellas muestras que no cumplieron con los criterios de concentración o calidad fueron sometidas a un proceso de preamplificación dirigida, ya que en muestras con <100 copias de ADNg/pocillo los eventos estocásticos pueden dominar la reacción. Además, las muestras con presencia de contaminantes pueden incluir inhibidores de PCR que al ser preamplificadas quedaron diluidos impidiendo interferencias en la reacción. Esto se llevó a cabo usando un *OpenArray PreAmp Pool* personalizado, específico para el conjunto de ensayos en el proyecto. Brevemente: el *pool* de cebadores se mezcló con 0,4-4 ng/ μ L de ADN y *TaqMan PreAmp Master Mix 2X* en una placa de 96 pocillos, la cual fue sometida a un termociclado de 95°C durante 10 minutos para activar la enzima seguidos de 12 ciclos de 15 segundos a 95°C y 4 minutos a 60°C (*annealing*/extensión), y por último 10 minutos a 99,9°C para inactivar la

reacción. El producto resultante fue diluido 20 veces y usado sin necesidad de normalización en las matrices.

La discriminación alélica fue llevada a cabo usando el *software Genotyping v.3.5* (disponible en ThermoFisher *Cloud*). La configuración del análisis se programó usando el método *Autocalling* para analizar los datos de *Real-time Rn*, fijando un umbral de amplificación de entre 5-15 ciclos. Las muestras sometidas a preamplificación por criterios de concentración o calidad fueron discriminadas usando paneles de referencia para cada ensayo. Adicionalmente, se ajustaron los siguientes parámetros para el análisis, descartando las muestras, ensayos o matrices que no cumplieran con los requisitos expuestos en la Tabla 7.

Tabla 7. *Parámetros ajustados para el control de calidad del proceso de genotipado.*

Icon	Flag Name	Value	Condition	Threshold
	Failed Control			
	Genotype Quality Low	Quality	Less than	0,95
	Low Passive Ref	Passive Ref	Less than	0
	NTC Allele 2 Intensity High	Allele 2	Greater than	3000
	NTC Allele 1 Intensity High	Allele 1	Greater than	2000
	Reference Sample Discordance			
	Replicate Sample Discordance			
	Experiment Low ROX™ Rate High	Percentage	Greater than	10,0%
	Assay Call Rate Low	Percentage	Less than	90,0%
	Experiment Call Rate Low	Percentage	Less than	90,0%
	Sample Call Rate Low	Percentage	Less than	90,0%

Asimismo, se aplicó el algoritmo para la normalización de *clusters* en los ensayos necesarios y se usó el cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg

para detectar fallos en el genotipado, estratificación o tamaño insuficiente de la población y procesos endogámicos. Este principio expone que, en ausencia de selección, emparejamiento selectivo o deriva génica, las frecuencias alélicas y genotípicas de una población permanecen constantes de una generación a otra, por tanto, las frecuencias observadas no deberían ser significativamente distintas de las esperadas. Así, para dos alelos, 1 y 2, con frecuencias p y q , respectivamente, tendríamos que las frecuencias esperadas para cada genotipo serían:

$$np^2(1,1)/2 \quad npq(1,2)/nq^2(2,2)$$

De esta manera, se compararon las frecuencias esperadas frente a las observadas en el grupo control (pacientes sin EH en el seguimiento) usando la prueba de bondad de ajuste chi-cuadrado de Pearson, con un nivel de significancia $\alpha=10^{-3}$. Para evitar los errores tipo I y tipo II, los ensayos que mostraron una desviación del equilibrio fueron descartados. Como control adicional, se comprobó la ausencia de genotipos heterocigotos en individuos varones en la variante en el cromosoma X.

4.3.5 Análisis microsatélite

Para el análisis del microsatélite en el promotor de *GLS* se hizo una amplificación previa de la región de interés por PCR en una mezcla de 20 μ L de volumen de *DreamTaq PCR Master Mix 2X* (ThermoFisher, CA, EEUU), agua desionizada, 0,5 μ M de cada cebador y hasta 50 ng de ADN. Las secuencias de los cebadores usados fueron: *forward* 5'-TAG CCC TCC CCT GCG CTT TA-3' y *reverse* 5'-TGG GGC GGT GAG ATG ACA GAA-3' (Tib Molbiol, Berlín, Alemania). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, *annealing* a 57°C por 30 segundos y extensión

durante 1 minuto. Para finalizar, se añadió un paso de extensión durante 10 minutos adicionales.

Los cebadores fueron diseñados usando la herramienta *Primer-Blast* (disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>); las Tm fueron calculadas usando el software *Primer3* v.4.1.0 (disponible en <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Además, fueron comprobados mediante PCR *in silico* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) de acuerdo al ensamblaje GRCch38/hg38 resultando un amplicón de 204 pb que incluye 16 repeticiones GCA:

```
>chr2:190880796+190880999 204bp
TAGCCCTCCCTGCGCTTTAgcctcagtgcggagccttagggagcgaa
gagaaccggtcgcggaatcctagcgcgcagcagcagcagcagcagc
agcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ccggaaccacacccaagtagctgccctttcctcTTCTGTCATCTCACCGC
CCCA
```

Así, pudimos corroborar que el tamaño del amplicón está determinado por 156 bases a las que se suman un número variable de repeticiones. Gracias a esto pudimos calcular el número exacto de repeticiones como: $Nrep = (\text{tamaño total} - 156) / 3$, redondeando al número entero más cercano.

El análisis del microsatélite se llevó a cabo separando por tamaño los amplicones obtenidos a través de electroforesis capilar. Para ello, 1 µL de los productos de PCR fluorescentes (usando el cebador *reverse* 5'– 6FAM-TGG GGC GGT GAG ATG ACA GAA –3') se diluyó 1:10 en una mezcla con 8,5 µL de formamida altamente desionizada y 0,5 µL del marcador estándar GeneScan600LIZ (ThermoFisher, CA, EEUU). Previamente a la inyección de las muestras, estas fueron desnaturalizadas mediante la incubación durante 3 minutos a 98°C, y después mantenidas en hielo hasta la carga. La separación se llevó a cabo en el analizador genético ABI 3500

siguiendo el módulo de carrera preestablecido “*FragmentAnalysis50_POP7*”. Brevemente, las muestras pasaron por un capilar de 50 cm de longitud con el polímero POP7 en las condiciones: temperatura horno de 60°C, tiempo y voltaje de carrera 1330 s a 19,5 kV, tiempo y voltaje de inyección 8 s a 1,6 kV, respectivamente. Los resultados fueron analizados usando el *software PeakScanner* v.3.4.1 (ThermoFisher, CA, EEUU) siguiendo la metodología descrita previamente (228). La calidad de la medida fue controlada a través de los picos del marcador de tamaños y por el parámetro *Sizing Quality*; las muestras con un valor por debajo de 0,75 o con picos fuera de la escala se excluyeron del análisis posterior. Los resultados que pasaron el control de calidad según los parámetros del *software QualityCheck* (ThermoFisher, CA, EEUU) fueron validados mediante un nuevo análisis usando *Geneious* v.11.1.5 (Biomatters, Auckland, Nueva Zelanda).

Para corroborar la eficacia del sistema de medida, se incluyeron muestras aleatorias en una electroforesis en gel de agarosa al 2%, usando TBE 1X, *SYBR Safe* 10.000X (ThermoFisher, CA, EEUU) y un voltaje de 10 v/cm en la carrera en presencia del marcador de tamaños *DNA Ladder 100bp* (Invitrogen, ThermoFisher, CA, EEUU). El gel fue revelado tras excitación UV en el ChemiDoc XRS+ (BioRad, CA, EEUU). Además, muestras con un análisis primario resultando en homocigotas para el tamaño del microsatélite fueron sometidas a secuenciación a fin de determinar la secuencia y longitud exacta de los amplicones, y evaluar así la eficacia del análisis por electroforesis capilar.

4.4 Análisis estadístico

Las características basales de los pacientes se resumieron como porcentajes para variables categóricas y como media \pm DE para las variables continuas. Las diferencias entre las distintas variables se analizaron mediante pruebas de supervivencia: descripción de las estimaciones según el método Kaplan-Meier y comparación de curvas con el test log-Rank como prueba para variables categóricas, y el modelo de riesgos proporcionales de Cox como modelo de regresión para variables continuas. La relación lineal entre variables se midió siguiendo el coeficiente de correlación de Pearson.

El nivel de asociación genotipo-fenotipo se examinó comparando las frecuencias genóticas entre casos y controles utilizando regresiones logísticas ajustando por edad y sexo siguiendo el modelo definido por la ecuación:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$$

en donde “p” es la probabilidad de tener EH, “G” es el genotipo y “Z” las variables por las que se ajusta el modelo. Con este modelo como base, se exploró la asociación de cada variante siguiendo los distintos tipos de herencia (dominante, recesivo, codominante, aditivo y sobredominante). La magnitud de la asociación fue examinada mediante el cálculo de las OR (con intervalo de confianza del 95%) de cada genotipo respecto del de referencia. La verosimilitud de ajuste a cada modelo genético se comparó usando los parámetros *Akaike's Information Criterion* (AIC) y *Bayesian Information Criterion* (BIC) utilizando la herramienta *on-line* SNPStats (www.snpstats.net). Las variantes presentes en el gen *GLS* fueron sometidas a distintos modelos usando regresión logística ajustando por edad y sexo. Los modelos fueron comparados de nuevo usando el AIC como parámetro

de selección de ajuste. Aquellos modelos con significación estadística fueron sometidos a análisis de supervivencia para estudiar la estratificación en el tiempo por medio del método Kaplan-Meier usando la prueba no paramétrica de Mantel-Cox como estadístico (log-Rank *test*).

Las variables con diferencias significativas ($p < 0,05$) en el análisis univariante fueron introducidas en una regresión multivariante por riesgos competitivos siguiendo la estrategia propuesta por Fine y Gray. A fin de evitar posibles factores de confusión, aquellos parámetros con una potencial relevancia clínica, aunque no resultasen significativos, como la edad, el sexo o la presencia previa de EH fueron igualmente incluidos en el modelo. De manera similar, para evitar la presencia de factores potencialmente redundantes, se excluyeron del modelo multivariante los componentes de los índices de función hepática Child-Pugh o MELD, si estos estaban incluidos en el mismo. El desarrollo de EH durante el seguimiento fue considerada la variable dependiente, teniendo en cuenta a la muerte no relacionada con la enfermedad hepática o al trasplante debido a carcinoma hepatocelular como eventos competitivos. La probabilidad de concordancia de cada modelo se examinó mediante el índice C de Harrell.

Las diferencias entre las cohortes de estimación y validación se analizaron mediante las pruebas de la U de Mann-Whitney o t de Student para variables continuas, y los tests de chi-cuadrado de Pearson o el exacto de Fisher (si alguna casilla tuviera un número de casos inferior a 5) para variables categóricas tomando como referencia un valor de p bilateral $< 0,05$.

Para analizar el efecto de la genética respecto del grado de disfunción hepática, el MELD se categorizó en tres grupos. El primero, MELD < 10 se identificó mediante el análisis de la curva ROC (*receiving operator*

characteristic); AUROC: 0,71 (95% de intervalo de confianza asintótico: 0,64-0,78), $p < 0,001$; sensibilidad 60,4% y especificidad 71,3%. El segundo grupo (MELD > 15) se creó basándose en el consenso para la inclusión en la lista de espera de trasplante. El tercer grupo incluyó los pacientes con índice MELD entre 10 y 15 puntos.

Los análisis estadísticos y las gráficas fueron llevados a cabo usando los *softwares* SPSS (v.25; SPSS, IBM, IL, EEUU), STATA MP (v.14; StataCorp LLC, TX, EEUU) y GraphPad Prism (v.7; GraphPad Software, CA, EEUU).

5 RESULTADOS

5.1 Características basales de los participantes

De los 336 pacientes que aceptaron participar en el estudio, 41 fueron excluidos por presentar disfunción hepática grave (índice Child-Pugh C) o hepatocarcinoma en el momento del reclutamiento, o bien por tener un tiempo de seguimiento inferior a seis meses. De esta manera, se incluyeron en primera instancia un total de 295 pacientes en la cohorte de estimación (ver *patient flowchart*, Anexo: Material suplementario). De manera general, la edad media de los individuos participantes fue de $56,8 \pm 10,1$ años, con predominancia de hombres (71,9%). La etiología más frecuente de la cirrosis fue la alcohólica (50,5%), seguida de la hepatitis por virus C (33,6%) y por virus B (5,4%). El resto de pacientes, clasificados como “Otros”, tenían cirrosis por hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria o EHGNA. En el momento de la inclusión, observamos que la función hepática de estos pacientes se encontraba conservada: índice Child-Pugh A (74,6%), Child-Pugh B (25,4%); MELD $9,9 \pm 3,5$. De la misma forma, comprobamos que el 12,1% había experimentado al menos un episodio previo de EH, y se detectó la presencia de EH mínima por una FCP patológica en el 37,4% y por PHES en el 26,3% de los pacientes. Respecto de otras complicaciones, el 45,5% había sufrido ascitis y el 19% algún episodio de hemorragia de varices esofágicas de manera previa a la inclusión en el estudio (Tabla 8).

Tabla 8. *Características clínicas y demográficas basales de los pacientes incluidos en el estudio.*

Variable	Cohorte de estimación (n=295)
Edad ± DE (años)	56,8 ± 10,1
Sexo masculino	71,9% (212/295)
Etiología	
Alcohol	50,5% (149/295)
Virus	39,3% (116/295)
Otros	10,2% (30/295)
Índice Child-Pugh, A/B	220/75
Índice MELD ± DE	9,9 ± 3,5
EH previa	12,2% (36/295)
EHM	
PHES (<-4)	26,3% (59/224)
CFF (<39Hz)	37,4% (91/243)
Ascitis previa	45,5% (135/295)
HVE previa	19,0% (56/295)
PBE previa	3,1% (9/295)
SHR previo	13,6% (40/295)
Trasplante Hepático	9,2% (27/295)
Éxito	24,7% (73/295)
Causa hepática	75,0% (54/73)

5.2 Variables asociadas con el desarrollo de EH

Se consideró como “tiempo cero” el momento de la primera visita y se estableció un límite de seguimiento máximo a los 60 meses. La incidencia de EH fue de 23,3% (69/295). El análisis univariado de la cohorte nos permitió determinar que estos individuos tenían, en el momento del reclutamiento, una edad superior y una función hepática más deteriorada

según los índices Child-Pugh y MELD. Asimismo, observamos que haber sufrido previamente un episodio de EH se encontraba asociado con el desarrollo de EH durante el seguimiento. Además, se asoció la presencia de EH con un peor pronóstico en términos de necesidad de trasplante y éxitos, sobre todo si tenemos en cuenta el fallecimiento de causa hepática. Igualmente, hallamos una asociación entre niveles incrementados de bilirrubina, AST, creatinina e INR y con niveles descendidos de albúmina, plaquetas y sodio y el desarrollo de EH (Tabla 9).

Tabla 9. *Parámetros asociados al desarrollo de EH en el seguimiento.*

Variable	No EH (n=226)	EH (n=69)	HR (95% IC)	p-valor
Edad ± DE, años	56,3 ± 9,6	58,4 ± 11,6	1,017 (0,993-1,042)	0,176
Sexo masculino	73,0% (165/226)	68,1% (47/69)	0,826 (0,498-1,371)	0,461
Etiología				
Alcohol	52,2% (118/226)	44,9% (31/69)		
Virus	38,5% (87/226)	42,0% (29/69)	1,258 (0,758-2,088)	0,374
Otros	9,3% (21/226)	13,0% (9/69)	1,446 (0,688-3,037)	0,330
Índice Child-Pugh, A	81,0% (183/226)	53,6% (37/69)	4,228 (2,615-6,834)	<0,001
Índice MELD ± DE	9,4 ± 2,9	11,9 ± 3,9	1,195 (1,132-1,262)	<0,001
EH previa	9,5% (20/226)	19,0% (16/69)	2,347 (1,323-4,164)	0,004
EHM	12,0% (19/158)	14,6% (7/48)	1,454 (0,650-3,252)	0,363
PHES	-2,47 ± 3,00	-3,20 ± 3,16	0,918 (0,843-1,000)	0,049
(<-4)	24,0% (41/171)	34,0% (18/53)	1,764 (0,996-3,124)	0,052
CFF	41,10 ± 4,52	40,04 ± 4,24	0,920 (0,865-0,978)	0,017
(<39Hz)	35,5% (65/183)	43,3% (26/60)	1,697 (1,018-2,851)	0,043
SOG				
Basal (≥78 µg/dL)	30,4% (51/168)	57,8% (37/64)	2,766 (1,683-4,547)	<0,001
Δ (≥33 µg/dL)	50,3% (77/153)	71,2% (42/59)	2,159 (1,229-3,795)	0,007
Albúmina ± DE (g/L)	40,4 ± 5,9	36,2 ± 5,9	0,877 (0,841-0,915)	<0,001
Bilirrubina ± DE (mg/dL)	1,32 ± 1,09	1,98 ± 1,15	1,286 (1,157-1,429)	<0,001
Plaquetas ± DE (x 10⁹/L)	127,3 ± 73,4	102,4 ± 58,4	0,991 (0,986-0,997)	<0,001
AST ± DE (UI/L)	49,0 ± 39,2	67,8 ± 48,7	1,010 (1,005-1,015)	<0,001
ALT ± DE (UI/L)	43,1 ± 37,3	48,2 ± 32,3	1,003 (0,998-1,009)	0,261
Sodio ± DE (mmol/L)	140,2 ± 3,0	138,7 ± 4,2	0,884 (0,830-0,942)	<0,001
INR ± DE	1,20 ± 0,25	1,29 ± 0,28	2,416 (1,348-4,332)	0,003
Creatinina ± DE (mg/dL)	0,87 ± 0,21	0,94 ± 0,39	2,579 (1,022-6,512)	0,045
Leucocitos ± DE (cels/x 10⁹/L)	5,65 ± 2,10	5,80 ± 2,43	1,000 (1,000-1,000)	0,928
Trasplante Hepático	7,5% (17/226)	14,5% (10/69)	1,943 (0,993-3,801)	0,048
Éxito	18,6% (42/226)	44,9% (31/69)	3,410 (2,113-5,501)	<0,001
Causa hepática	61,9% (26/42)	90,3% (28/31)	5,761 (1,370-24,223)	0,017

5.3 Genes y polimorfismos seleccionados

Explorando las rutas con implicación conocida en la fisiopatología de la enfermedad, se generaron varias listas de genes que compartían una función biológica o molecular dada en diferentes procesos como:

- Metabolismo de amonio.
- Metabolismo y transporte de glutamina.
- Transporte de glutamato y otros neurotransmisores.
- Regulación de la respuesta inmune innata.
- Regulación de la respuesta inflamatoria aguda.
- Estrés oxidativo.
- Autofagia.
- Señalización de ácidos biliares.
- Respuesta a moléculas de origen bacteriano/integridad de la barrera intestinal.
- Transporte de manganeso.

En la Tabla 10 se muestran los genes candidatos según el sistema de priorización en base a la función biológica y molecular de la proteína para la que codifican siguiendo los términos de *GeneOntology*. Además, se muestran las variantes seleccionadas junto a su MAF y a la predicción de la consecuencia sobre el gen. De esta manera, se seleccionaron 60 variantes en las regiones de influencia de hasta 42 genes distintos.

Tabla 10. Genes y polimorfismos seleccionados.

ID SNP	Variante	MAF	Consecuencia	Gen	Proteína	GO - Molecular function	GO - Biological function
rs3771310	NC_000002.12:g.190908462A>G	G=0.240	Intón	<i>GLS</i>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	GO:0004359 glutaminase activity	GO:0006541 glutamine metabolic process
rs6743496	NC_000002.12:g.190912589A>G	A=0.358	Intón	<i>GLS</i>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	GO:0004359 glutaminase activity	GO:0006541 glutamine metabolic process
rs2883713	NC_000002.12:g.190923691G>A	G=0.377	Intón	<i>GLS</i>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	GO:0004359 glutaminase activity	GO:0006541 glutamine metabolic process
rs3088307	NC_000002.12:g.190964686C>G	G=0.499	3' UTR	<i>GLS</i>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	GO:0004359 glutaminase activity	GO:0006541 glutamine metabolic process
rs13395505	NC_000002.12:g.190973788G>A	A=0.382	5' UTR	<i>GLS</i>	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	GO:0004359 glutaminase activity	GO:0006541 glutamine metabolic process
rs10911021	NC_000001.11:g.182112825C>T	T=0.317	5' UTR	<i>GLUL</i>	Glutamine synthetase	GO:0004356 glutamate-ammonia ligase activity	GO:0006541 glutamine metabolic process
rs7549329	NC_000001.11:g.182394284G>A	G=0.406	3' UTR	<i>GLUL</i>	Glutamine synthetase	GO:0004356 glutamate-ammonia ligase activity	GO:0006541 glutamine metabolic process
rs715	NC_000002.12:g.210678331T>C	C=0.316	3' UTR	<i>CPS1</i>	Carbamoyl-phosphate synthase 1	GO:0004087 carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) activity	GO:0000050 urea cycle
rs1047891	NC_000002.12:g.210675783C>A	A=0.313	Cambio de sentido	<i>CPS1</i>	Carbamoyl-phosphate synthase 1	GO:0004087 carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) activity	GO:0000050 urea cycle
rs186636	NC_000017.11:g.44008604C>T	C=0.367	3' UTR	<i>NAGS</i>	N-acetylglutamate synthase	GO:0004042 acetyl-CoA:L-glutamate N-acetyltransferase activity	GO:0000050 urea cycle
rs228771	NC_000017.11:g.44006729C>G	G=0.412	Intón	<i>NAGS</i>	N-acetylglutamate synthase	GO:0004042 acetyl-CoA:L-glutamate N-acetyltransferase activity	GO:0000050 urea cycle
rs13830	NC_000007.14:g.66086944T>C	T=0.251	Intón	<i>ASL</i>	Arginine succinate liase	GO:0004056 argininosuccinate lyase activity	GO:0000050 urea cycle
rs10814988	NC_000009.12:g.4483912G>A	A=0.189	3' UTR	<i>SLC1A1</i>	Excitatory amino acid transporter 3	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity	GO:0015807 L-amino acid transport
rs301430	NC_000009.12:g.4576680T>C	C=0.308	Sinónima	<i>SLC1A1</i>	Excitatory amino acid transporter 3	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity	GO:0015807 L-amino acid transport
rs4354668	NC_000011.10:g.35419429T>G	G=0.409	Intón	<i>SLC1A2</i>	Excitatory amino acid transporter 2	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity	GO:0015807 L-amino acid transport
rs752949	NC_000011.10:g.35306201C>T	T=0.258	Intón	<i>SLC1A2</i>	Excitatory amino acid transporter 2	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity	GO:0015807 L-amino acid transport

ID SNP	Variante	MAF	Consecuencia Gen	Proteína	GO - Molecular function	GO - Biological function
rs2269272	NC_000005.10:g.3668754C>T	T=0.219	3' UTR	<i>SLC1A3</i>	Excitatory amino acid transporter 1	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs2562582	NC_000005.10:g.36605258C>T	C=0.201	2Kb Upstream	<i>SLC1A3</i>	Excitatory amino acid transporter 1	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs8105903	NC_000019.10:g.46784893C>G	C=0.446	Intrón	<i>SLC1A5</i>	Neutral amino acid transporter B(0)	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs2070246	NC_000019.10:g.46778905G>A	A=0.204	Sinónima	<i>SLC1A5</i>	Neutral amino acid transporter B(0)	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs313853	NC_000019.10:g.46784682T>C	C=0.333	Intrón	<i>SLC1A5</i>	Neutral amino acid transporter B(0)	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs35742391	NC_000003.12:g.50219957G>A	A=0.096	Sinónima	<i>SLC38A3</i>	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs2293953	NC_000023.11:g.48467829G>A	G=0.175	Intrón	<i>SLC38A5</i>	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs4975611	NC_000005.10:g.1194214T>A	T=0.217	3' UTR	<i>SLC6A19</i>	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT1	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs11746371	NC_000005.10:g.1219744C>T	T=0.418	Intrón	<i>SLC6A19</i>	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT1	GO:0015171 amino acid transmembrane transporter activity
rs279858	NC_000004.12:g.46312576T>C	C=0.425	Sinónima	<i>GABRA2</i>	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-2	GO:0004890 GABA-A receptor activity
rs4880213	NC_000009.12:g.137136549C>T	T=0.424	2Kb Upstream	<i>GRIIN1</i>	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1	GO:0042165 neurotransmitter binding
rs1805247	NC_000012.12:g.13563041A>G	G=0.089	Sinónima	<i>GRIIN2B</i>	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	GO:0042165 neurotransmitter binding
rs2286629	NC_000002.12:g.221442590C>A	C=0.180	Intrón	<i>EPHA4</i>	Ephrin type-A receptor 4	GO:0004672 protein kinase activity
rs1440581	NC_000004.12:g.88305270T>C	T=0.486	2Kb Upstream	<i>PFM1K</i>	Protein phosphatase 1K, mitochondrial	GO:0004722 protein serine/threonine phosphatase activity
rs5743708	NC_000004.12:g.153705165G>A	A=0.026	Cambio de sentido	<i>TLR2</i>	Toll-like receptor 2	GO:0001530 lipopolysaccharide binding

ID SNP	Variante	MAF	Consecuencia Gen	Proteína	GO - Molecular function	GO - Biological function
rs4986790	NC_000009.12.g.117713024A>G	G=0.063	Cambio de sentido	<i>TLR4</i>	GO:0001530 lipopolysaccharide binding	GO:0045089 positive regulation of innate immune response
rs2569190	NC_000005.10.g.140633331A>G	A=0.451	Intrón	<i>CD14</i>	GO:0001530 lipopolysaccharide binding	GO:0045089 positive regulation of innate immune response
rs5743836	NC_000003.12.g.52226766A>G	G=0.126	2Kb Upstream	<i>TLR9</i>	GO:0005149 interleukin-1 receptor binding	GO:0045089 positive regulation of innate immune response
rs5743289	NC_000001.6.g.50722863C>T	T=0.140	Intrón	<i>NOD2</i>	GO:0042834 peptidoglycan binding	GO:0045089 positive regulation of innate immune response
rs17221417	NC_000016.10.g.50705671C>G	G=0.276	Intrón	<i>NOD2</i>	GO:0042834 peptidoglycan binding	GO:0045089 positive regulation of innate immune response
rs10065172	NC_000005.10.g.150848436C>T	T=0.076	Sinónima	<i>IRGM</i>	GO:0019901 protein kinase binding	GO:0045089 positive regulation of innate immune response
rs1800795	NC_000007.14.g.22727026C>G	C=0.460	Intrón	<i>IL6</i>	GO:0005125 cytokine activity	GO:0002675 positive regulation of acute inflammatory response GO:0071219 cellular response to molecule of bacterial origin
rs1800629	NC_000006.12.g.31575254G>A	A=0.159	2Kb Upstream	<i>TNF</i>	GO:0005125 cytokine activity	GO:1903426 regulation of reactive oxygen species biosynthetic process GO:0002675 positive regulation of acute inflammatory response GO:0071219 cellular response to molecule of bacterial origin
rs35829419	NC_000001.11.g.247425556C>A	A=0.051	Cambio de sentido	<i>NLRP3</i>	GO:0042834 peptidoglycan binding	GO:0071219 cellular response to molecule of bacterial origin
rs689466	NC_000001.11.g.186681619T>C	C=0.184	2Kb Upstream	<i>PTGS2</i>	GO:0004601 peroxidase activity	GO:1903426 regulation of reactive oxygen species biosynthetic process GO:0002675 positive regulation of acute inflammatory response
rs1024611	NC_000017.11.g.34252769A>G	G=0.286	2Kb Upstream	<i>CCL2</i>	GO:0008009 chemokine activity	GO:0071219 cellular response to molecule of bacterial origin
rs2669845	NC_000003.12.g.39279727T>C	T=0.115	Intrón	<i>CX3CR1</i>	GO:0004950 chemokine receptor activity	GO:1903426 regulation of reactive oxygen species biosynthetic process GO:0071219 cellular response to molecule of bacterial origin

ID SNP	Variante	MAF	Consecuencia	Gen	Proteína	GO - Molecular function	GO - Biological function
rs959106	NC_000003.12:g.108760670A>G	G=0.169	2Kb Upstream	<i>RETNLB</i>	Resistin-like beta		GO:0005179 hormone activity
rs3814058	NC_000003.12:g.11981844T>C	C=0.216	3' UTR	<i>NR112</i>	Nuclear receptor subfamily 1 group 1 member 2	GO:0004879 nuclear receptor activity	GO:0006805 xenobiotic metabolic process
rs601338	NC_000019.10:g.48703417G>A	A=0.458	Sin sentido	<i>FUT2</i>	Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 2	GO:0008417 fucosyltransferase activity	GO:0005975 carbohydrate metabolic process
rs10210302	NC_000002.12:g.233250193C>T	T=0.486	2Kb Upstream	<i>ATG16L1</i>	Autophagy-related protein 16-1	GO:0019787 ubiquitin-like protein transferase activity	GO:0061912 selective autophagy
rs241880	NC_000002.12:g.233274722A>G	A=0.489	Cambio de sentido	<i>ATG16L1</i>	Autophagy-related protein 16-1	GO:0019787 ubiquitin-like protein transferase activity	GO:0061912 selective autophagy
rs2303015	NC_000017.11:g.48852546T>C	C=0.043	Cambio de sentido	<i>CALCOCO2</i>	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2	GO:0042803 protein homodimerization activity	GO:0061912 selective autophagy
rs550510	NC_000017.11:g.48849253G>C	A=0.363	Cambio de sentido	<i>CALCOCO2</i>	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2	GO:0042803 protein homodimerization activity	GO:0061912 selective autophagy
rs4880	NC_000006.12:g.159692840A>G	G=0.493	Cambio de sentido	<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	GO:0030145 manganese ion binding	GO:0006979 response to oxidative stress
rs1800849	NC_000011.10:g.74009120C>A	A=0.282	5' UTR	<i>UCP3</i>	Mitochondrial uncoupling protein 3	GO:0017077 oxidative phosphorylation uncoupler activity	GO:0006979 response to oxidative stress
rs3017887	NC_000011.10:g.89492920A>C	A=0.191	Intrón	<i>NOX4</i>	NADPH oxidase 4	GO:0016174 NAD(P)H oxidase activity	GO:0006979 response to oxidative stress
rs761142	NC_000006.12:g.53527310A>C	C=0.274	Intrón	<i>GCLC</i>	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	GO:0016595 glutamate binding	GO:0006534 cysteine metabolic process GO:0006979 response to oxidative stress
rs17883901	NC_000006.12:g.53545239C>A	A=0.064	2Kb Upstream	<i>GCLC</i>	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	GO:0016595 glutamate binding	GO:0006534 cysteine metabolic process GO:0006979 response to oxidative stress
rs6586282	NC_000021.9:g.4305838T>T	T=0.142	No codificante	<i>CBS</i>	Cystathionine beta-synthase	GO:0004122 cystathionine beta-synthase activity	GO:0006534 cysteine metabolic process

ID SNP	Variante	MAF	Consecuencia	Gen	Proteína	GO - Molecular function	GO - Biological function
rs6971	NC_000022.11:g.43162920A>G	A=0.320	Cambio de sentido	<i>TSP0</i>	Translocator protein	GO:0008503 benzodiazepine receptor activity	GO:1905802 regulation of cellular response to manganese ion GO:1903427 negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
rs281860284	NC_000001.11:g.219928175A>G		Cambio de sentido	<i>SLC30A10</i>	Zinc transporter 10	GO:0005384 manganese ion transmembrane transporter activity	GO:1905802 regulation of cellular response to manganese ion GO:1903427 negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
rs56163822	NC_000012.12:g.100493323G>T	T=0.022	No codificante	<i>NR1H4</i>	Bile acid receptor	GO:0032052 bile acid binding	GO:0038183 bile acid signaling pathway
rs11110385	NC_000012.12:g.100458927C>T	T=0.393	2Kb Upstream	<i>NR1H4</i>	Bile acid receptor	GO:0032052 bile acid binding	GO:0038183 bile acid signaling pathway

5.4 Análisis de polimorfismos

5.4.1 Genotipado

Tras el análisis del control de calidad del genotipado, se excluyó una muestra por no cumplir los criterios mínimos de *Sample call rate*. De manera similar, y teniendo en cuenta el criterio *Assay call rate*, un ensayo, el correspondiente a la variante ID:rs3814058 fue eliminado de los análisis posteriores.

Teniendo en cuenta el supuesto que propone el equilibrio de Hardy-Weinberg, según el cual los alelos se segregan de manera aleatoria en la población, pudimos calcular las frecuencias esperadas de cada genotipo, partiendo de las frecuencias alélicas observadas. A través de una comparación entre las frecuencias (observadas y esperadas), descubrimos que los SNPs rs689466, rs2288629 y rs2293953 no cumplían este principio al menos en la población control, por lo que fueron eliminados de posteriores análisis (Tablas 11-13).

Tabla 11. Comparativa entre las frecuencias esperadas y observadas para el cumplimiento del equilibrio Hardy-Weinberg en el SNP rs689466.

rs689466 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=269)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
<i>All subjects</i>	185	36	48	406	132	<0.0001
<i>STATUS=0-Control</i>	138	33	35	309	103	<0.0001
<i>STATUS=1-Case</i>	47	3	13	97	29	<0.0001

Tabla 12. Comparativa entre las frecuencias esperadas y observadas para el cumplimiento del equilibrio Hardy-Weinberg en el SNP rs2288629.

rs2288629 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=291)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
<i>All subjects</i>	189	66	36	444	138	<0.0001
<i>STATUS=0-Control</i>	145	52	26	342	104	<0.0001
<i>STATUS=1-Case</i>	44	14	10	102	34	0.00041

Tabla 13. Comparativa entre las frecuencias esperadas y observadas para el cumplimiento del equilibrio Hardy-Weinberg en el SNP rs2293953.

rs2293953 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=292)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
<i>All subjects</i>	233	25	34	491	93	<0.0001
<i>STATUS=0-Control</i>	178	19	27	375	73	<0.0001
<i>STATUS=1-Case</i>	55	6	7	116	20	<0.0001

No obstante, en ciertos casos se observó una desviación del equilibrio en población enferma. Esta desviación fue excusada debido a que podría suponer de hecho una asociación con el rasgo en estudio.

5.4.2 Análisis del microsatélite en el promotor de GLS

Siguiendo la metodología anteriormente descrita, se determinó la longitud del microsatélite en cada una de las muestras de ADN de los pacientes. En un primer análisis, se consiguió una determinación con éxito del 81,6% (241/295) de las muestras, teniendo en cuenta que: a) *Size Quality*>0,75, b) ausencia de picos confusión dentro o fuera del rango en estudio y c) muestras no saturadas. Observamos, además, que las muestras descartadas en la primera ronda guardaban correlación con la detección de contaminantes y/o baja calidad de ADN según la técnica espectrofotométrica (coeficiente 0,64; $p<0,001$).

Para corregir este efecto y conseguir una mayor eficiencia, se llevó a cabo una nueva PCR con las muestras de ADN diluidas 1:1 en agua ultrapura (estimación de 25 ng totales), pero aumentando el número de ciclos a 40. No obstante, 12 de las 54 muestras restantes no consiguieron pasar el control de calidad, que fueron sometidas a un nuevo proceso de amplificación, esta vez en dos pasos. Una primera PCR a 25 ciclos usando cebadores sin fluoróforo con 25 ng de ADN, y una segunda PCR a 35 ciclos usando 5 µL del producto primario y el cebador *reverse* marcado con fluorescencia (6-FAM). Así, se consiguió finalmente una determinación eficiente de la longitud en todos los pacientes como muestra el ejemplo en la Figura 6.

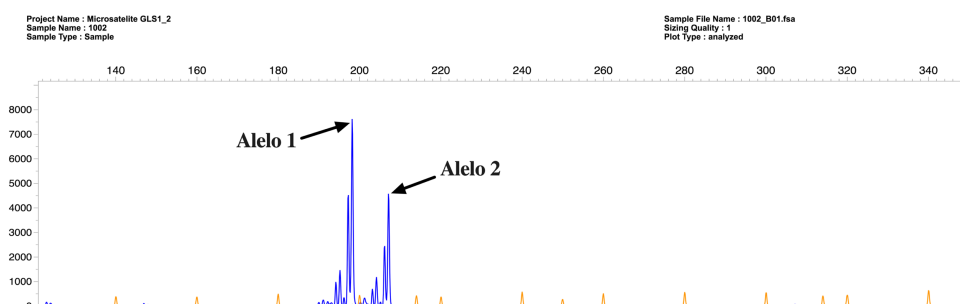


Figura 6. Imagen representativa del análisis del microsatélite.

Además, se determinó la secuencia de la región amplificada en muestras *a priori* homocigotas, con el objetivo de comprobar nuevamente la efectividad de la medición, del diseño de los cebadores y de la PCR *in silico* (Figura 7 a). Finalmente, para confirmar el cálculo de la longitud de los amplicones según la electroforesis capilar, se realizó una separación por carga y tamaño mediante electroforesis en gel de muestras seleccionadas,

las cuales mostraron una concordancia del 100% en la longitud estimada (Figura 7 b).

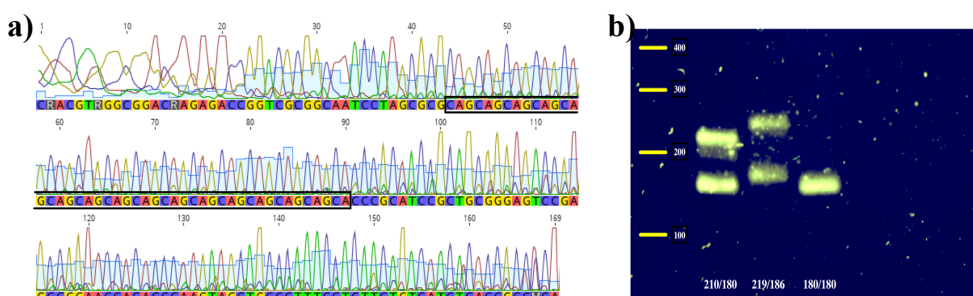


Figura 7. Comprobación de la eficacia de la medición de la longitud del microsatélite mediante a) secuenciación, b) electroforesis en gel de agarosa.

Los pacientes fueron entonces categorizados en tres grupos de acuerdo al genotipo, que se definió (en el trabajo previo) como “largo” en un punto de corte ≥ 14 repeticiones de GCA, teniendo en cuenta el carácter bimodal de la distribución. Así, la población se distribuyó de la siguiente manera: alelos “corto-corto” 16,3% (48/295), alelos “corto-largo” 53,5% (158/295) y “largo-largo” 30,2% (89/295).

5.5 Polimorfismos asociados con el desarrollo de EH

El análisis de asociación genotipo-fenotipo reveló ocho variantes asociadas a la prevalencia de EH, permitiéndonos además calcular el modelo de herencia con mayor probabilidad de ajuste: rs6586283 [CT-CC vs. TT; OR 1,73 (0,99-3,04); $p=0,05$], rs4880 [AG vs. AA-GG; OR 2,48 (1,40-4,42); $p=0,001$], rs35742391 [AG vs. GG; OR 0,27 (0,06-1,21); $p=0,046$], rs313830 [modelo aditivo; OR 0,52 (0,30-0,89); $p=0,012$], rs601338 [AG vs. AA-GG; OR 2,72 (1,54-4,80); $p<0,001$], rs2562582 [CT-

CC vs. TT; OR 1,97 (1,03-3,02); p=0,042], rs313853 [CT-CC vs.TT; OR 2,02 (1,13-3,63); p=0,016], rs5743836 [AG-GG vs. AA, OR 2,08 (1,18-3,65); p=0,012] (Tablas 14-21).

Tabla 14. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs4880.*

rs4880 association with response STATUS (n=285, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	68 (31.1%)	11 (16.7%)	1.00	0.0049	305.7	323.9
	A/G	95 (43.4%)	43 (65.2%)	2.96 (1.42-6.20)			
	G/G	56 (25.6%)	12 (18.2%)	1.44 (0.58-3.54)			
Dominant	A/A	68 (31.1%)	11 (16.7%)	1.00	0.01	307.8	322.4
	A/G-G/G	151 (69%)	55 (83.3%)	2.41 (1.18-4.94)			
Recessive	A/A-A/G	163 (74.4%)	54 (81.8%)	1.00	0.26	313	327.6
	G/G	56 (25.6%)	12 (18.2%)	0.67 (0.33-1.35)			
Overdominant	A/A-G/G	124 (56.6%)	23 (34.9%)	1.00	0.0015	304.3	318.9
	A/G	95 (43.4%)	43 (65.2%)	2.48 (1.40-4.42)			
Log-additive	---	---	---	1.19 (0.81-1.76)	0.38	313.5	328.1

Tabla 15. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs313830.*

rs313830 association with response STATUS (n=293, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	127 (56.4%)	49 (72.1%)	1.00	0.042	318.3	336.7
	T/C	86 (38.2%)	18 (26.5%)	0.54 (0.29-1.00)			
	T/T	12 (5.3%)	1 (1.5%)	0.21 (0.03-1.70)			
Dominant	C/C	127 (56.4%)	49 (72.1%)	1.00	0.02	317.3	332
	T/C-T/T	98 (43.6%)	19 (27.9%)	0.50 (0.27-0.91)			
Recessive	C/C-T/C	213 (94.7%)	67 (98.5%)	1.00	0.13	320.4	335.2
	T/T	12 (5.3%)	1 (1.5%)	0.26 (0.03-2.09)			
Overdominant	C/C-T/T	139 (61.8%)	50 (73.5%)	1.00	0.074	319.5	334.2
	T/C	86 (38.2%)	18 (26.5%)	0.58 (0.32-1.07)			
Log-additive	---	---	---	0.52 (0.30-0.89)	0.012	316.4	331.1

Tabla 16. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs313853.*

rs313853 association with response STATUS (n=285, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	T/T	106 (48.4%)	21 (31.8%)	1.00	0.045	310.1	328.4
	C/T	96 (43.8%)	40 (60.6%)	2.11 (1.16-3.84)			
	C/C	17 (7.8%)	5 (7.6%)	1.53 (0.51-4.63)			
Dominant	T/T	106 (48.4%)	21 (31.8%)	1.00	0.016	308.5	323.1
	C/T-C/C	113 (51.6%)	45 (68.2%)	2.02 (1.13-3.63)			
Recessive	T/T-C/T	202 (92.2%)	61 (92.4%)	1.00	0.99	314.3	328.9
	C/C	17 (7.8%)	5 (7.6%)	1.00 (0.35-2.85)			
Overdominant	T/T-C/C	123 (56.2%)	26 (39.4%)	1.00	0.018	308.6	323.3
	C/T	96 (43.8%)	40 (60.6%)	1.97 (1.12-3.46)			
Log-additive	---	---	---	1.53 (0.99-2.38)	0.057	310.7	325.3

Tabla 17. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs601338.*

rs601338 association with response STATUS (n=286, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	65 (29.7%)	17 (25.4%)	1.00	6e-04	303.5	321.8
	A/G	83 (37.9%)	41 (61.2%)	1.98 (1.02-3.83)			
	G/G	71 (32.4%)	9 (13.4%)	0.48 (0.20-1.16)			
Dominant	A/A	65 (29.7%)	17 (25.4%)	1.00	0.45	315.9	330.5
	A/G-G/G	154 (70.3%)	50 (74.6%)	1.27 (0.68-2.37)			
Recessive	A/A-A/G	148 (67.6%)	58 (86.6%)	1.00	0.0011	305.8	320.4
	G/G	71 (32.4%)	9 (13.4%)	0.31 (0.15-0.67)			
Overdominant	A/A-G/G	136 (62.1%)	26 (38.8%)	1.00	5e-04	303.3	318.9
	A/G	83 (37.9%)	41 (61.2%)	2.72 (1.54-4.80)			
Log-additive	---	---	---	0.77 (0.53-1.11)	0.16	314.5	329.1

Tabla 18. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs2562582.*

rs2562582 association with response STATUS (n=290, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	T/T	169 (76.1%)	44 (64.7%)	1.00	0.24	320.1	338.4
	C/T	51 (23%)	23 (33.8%)	1.65 (0.91-3.02)			
	C/C	2 (0.9%)	1 (1.5%)	2.20 (0.19-25.34)			
Dominant	T/T	169 (76.1%)	44 (64.7%)	1.00	0.042	317.2	330.8
	C/T-C/C	53 (23.9%)	24 (35.3%)	1.97 (1.03-3.02)			
Recessive	T/T-C/T	220 (99.1%)	67 (98.5%)	1.00	0.62	320.7	335.4
	C/C	2 (0.9%)	1 (1.5%)	1.91 (0.17-21.96)			
Overdominant	T/T-C/C	171 (77%)	45 (66.2%)	1.00	0.11	318.5	333.1
	C/T	51 (23%)	23 (33.8%)	1.63 (0.90-2.97)			
Log-additive	---	---	---	1.62 (0.93-2.82)	0.091	318.1	332.8

Tabla 19. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs5743836.*

rs5743836 association with response STATUS (n=292, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	157 (70.1%)	37 (54.4%)	1.00	0.041	317.9	336.3
	A/G	61 (27.2%)	28 (41.2%)	2.07 (1.16-3.71)			
	G/G	6 (2.7%)	3 (4.4%)	2.11 (0.50-8.95)			
Dominant	A/A	157 (70.1%)	37 (54.4%)	1.00	0.012	315.9	330.7
	A/G-G/G	67 (29.9%)	31 (45.6%)	2.08 (1.18-3.65)			
Recessive	A/A-A/G	218 (97.3%)	65 (95.6%)	1.00	0.51	321.9	336.6
	G/G	6 (2.7%)	3 (4.4%)	1.64 (0.40-6.81)			
Overdominant	A/A-G/G	163 (72.8%)	40 (58.8%)	1.00	0.02	316.9	331.6
	A/G	61 (27.2%)	28 (41.2%)	1.99 (1.12-3.53)			
Log-additive	---	---	---	1.80 (1.12-2.91)	0.017	316.6	331.3

Tabla 20. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs6586283.*

rs6586283 association with response STATUS (n=284, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	T/T	149 (69%)	38 (55.9%)	1.00	0.16	316.1	334.3
	C/T	63 (29.2%)	28 (41.2%)	1.72 (0.97-3.05)			
	C/C	4 (1.8%)	2 (2.9%)	1.93 (0.34-11.10)			
Dominant	T/T	149 (69%)	38 (55.9%)	1.00	0.05	314.1	328.7
	C/T-C/C	67 (31%)	30 (44.1%)	1.73 (0.99-3.04)			
Recessive	T/T-C/T	212 (98.2%)	66 (97.1%)	1.00	0.61	317.4	332
	C/C	4 (1.8%)	2 (2.9%)	1.59 (0.28-9.03)			
Overdominant	T/T-C/C	153 (70.8%)	40 (58.8%)	1.00	0.077	314.6	329.2
	C/T	63 (29.2%)	28 (41.2%)	1.68 (0.95-2.96)			
Log-additive	---	---	---	1.62 (0.98-2.67)	0.064	314.2	328.8

Tabla 21. *Análisis de asociación genotipo-fenotipo para el rs35742391.*

rs35742391 association with response STATUS (n=292, adjusted by SEX+AGE)							
Model	Genotype	Control	Case	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	G/G	204 (90.7%)	65 (97%)	1.00	0.046	316.3	331
	A/G	21 (9.3%)	2 (3%)	0.27 (0.06-1.21)			

Una vez establecido el modelo de herencia óptimo para cada polimorfismo, pudimos comprobar que seis de estas variantes estaban asociadas con la supervivencia libre de EH durante el seguimiento: rs4880 (AG vs. AA-GG; log-Rank 10,1; p<0,001), rs35742391 (AG vs. GG; log-Rank 3,9; p=0,049), rs601338 (AG vs. AA-GG; log-Rank 11,7; p<0,001), rs2562582 (CT-CC vs. TT; log-Rank 5,7; p=0,017), rs313853 (CT-CC

vs. TT; log-Rank 6,7; $p=0,010$), rs5743836 (AG-GG vs. AA, log-Rank 5,2; $p=0,022$) (Figura 8; a-f).

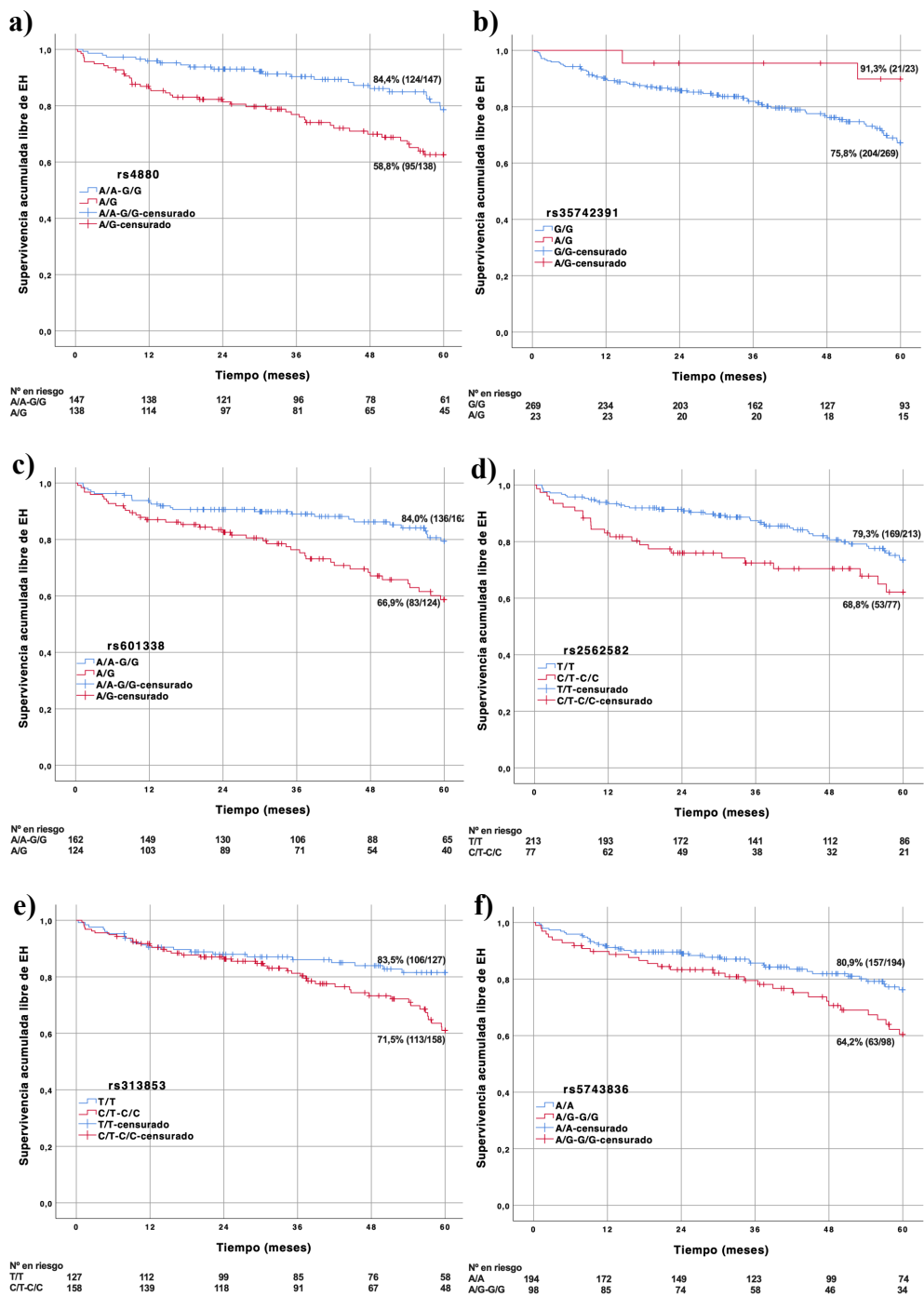


Figura 8. Supervivencia acumulada libre de EH para las variantes a) rs4880, b) rs35742391, c) rs601338, d) rs2562582, e) rs313853 y f) rs5743836.

5.5.1 Asociación de las variantes en *GLS* con el desarrollo de EH

Las variantes en el gen *GLS* mencionadas en este trabajo (haplotipo y microsatélite) demostraron en un estudio previo su asociación con el desarrollo de EH. Con el objetivo de confirmar esta asociación, y de estimar el riesgo que otorga ser portador de alguna de ellas en nuestro estudio, analizamos el poder de distintos modelos generados por las variables: microsatélite largo/largo vs. largo/corto-corto/corto y haplotipo TACC presencia vs. ausencia, corrigiendo en todos los casos por la edad y el sexo (Tabla 22), mediante regresión de Cox en la cohorte de estimación.

Tabla 22. Asociación entre las variantes en *GLS* y el desarrollo de EH.

Modelo	Haz. Ratio	IC 95%	P- valor	AIC
Haplotipo (ausencia)	2,032	1,144- 3,608	0,015	734,34
Microsatélite (largo-largo)	1,529	0,846- 2,761	0,159	714,66
Haplotipo o Microsatélite	2,126	1,159- 3,898	0,015	722,13
Haplotipo y Microsatélite	1,701	0,927- 3,121	0,087	713,02

Así, se seleccionó el modelo con un valor de AIC menor de entre los que alcanzaron la significación estadística y, de manera similar a lo descrito en el apartado anterior, se estimó la supervivencia acumulada libre de EH

para la variable generada por la presencia o ausencia de alguna de las variantes en *GLS*: *GLS*mut (log-Rank 7,8; p=0,020) (Figura 9).

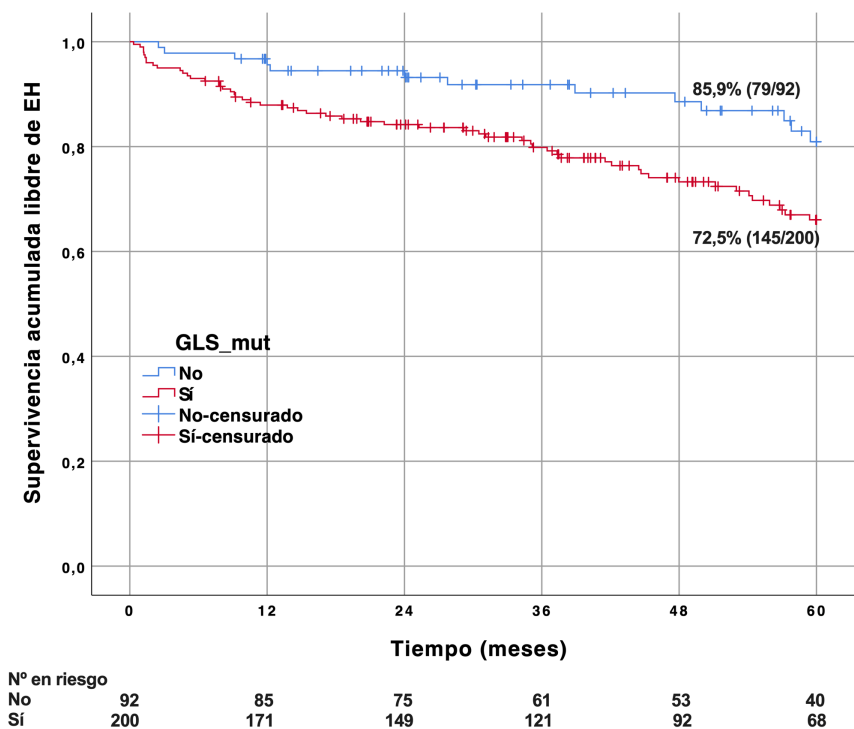


Figura 9. Supervivencia acumulada libre de EH para la variable generada por la presencia de alguna de las variantes en el gen *GLS*.

5.6 Análisis multivariante

Las variables con un p-valor<0,05 en el análisis univariante fueron sometidas a análisis de regresión multivariante por riesgos competitivos, donde el trasplante o el fallecimiento por causa no hepática se consideraron eventos competitivos con el desarrollo de EH. A fin de evitar la presencia de factores potencialmente redundantes en el modelo, se incluyó la evaluación de la función hepática según el índice MELD, excluyendo los

parámetros que lo componen (bilirrubina, creatinina, INR y sodio). La Tabla 23 muestra como los polimorfismos rs2562582 [*subHazard Ratio* (sHR) 2,420 (1,407-4,162); p=0,001], rs313853 [sHR 2,396 (1,294-4,437); p=0,005], rs5743836 [sHR 2,010 (1,216-3,322); p=0,006] y rs601338 [sHR 2,810 (1,568-5,039); p<0,001], junto a la variable generada por las variantes en *GLS* [sHR 2,190 (1,112-4,311); p=0,023], se asociaron al desarrollo de EH a 5 años, independientemente de otros factores.

Tabla 23. *Análisis multivariante de acuerdo al desarrollo de EH a cinco años en la cohorte de estimación.*

Variable	sHR	IC 95%	p-valor
Sexo masculino	1,192	0,644-2,206	0,576
Edad	1,023	0,992-1,055	0,142
EH previa (Sí)	2,635	1,225-5,661	0,013
Índice MELD	1,119	1,041-1,203	0,002
AST (UI/L)	1,004	0,998-1,010	0,188
Plaquetas (x 10⁹/L)	0,999	0,993-1,006	0,966
Albúmina (g/L)	0,882	0,841-0,925	<0,001
rs2562582 (CT-CC vs. TT)	2,420	1,407-4,162	0,001
rs313853 (CT-CC vs. TT)	2,396	1,294-4,437	0,005
rs5743836 (AG-GG vs. AA)	2,010	1,216-3,322	0,006
rs601338 (AG vs. AA-GG)	2,810	1,568-5,039	<0,001
GLSmut	2,027	1,112-4,110	0,043

Más aún, a través de una combinación de estas variantes pudimos identificar una huella genética que nos permitió clasificar a los pacientes en tres grupos según el riesgo [bajo riesgo (0-1 variantes), riesgo intermedio (2-3 variantes) o alto riesgo (4-5 variantes)] de desarrollar EH durante el

seguimiento a uno (log-Rank 15,368; $p<0,001$), tres (log-Rank 33,592; $p<0,001$) y cinco años (log-Rank 53,065; $p<0,001$) (Figura 10).

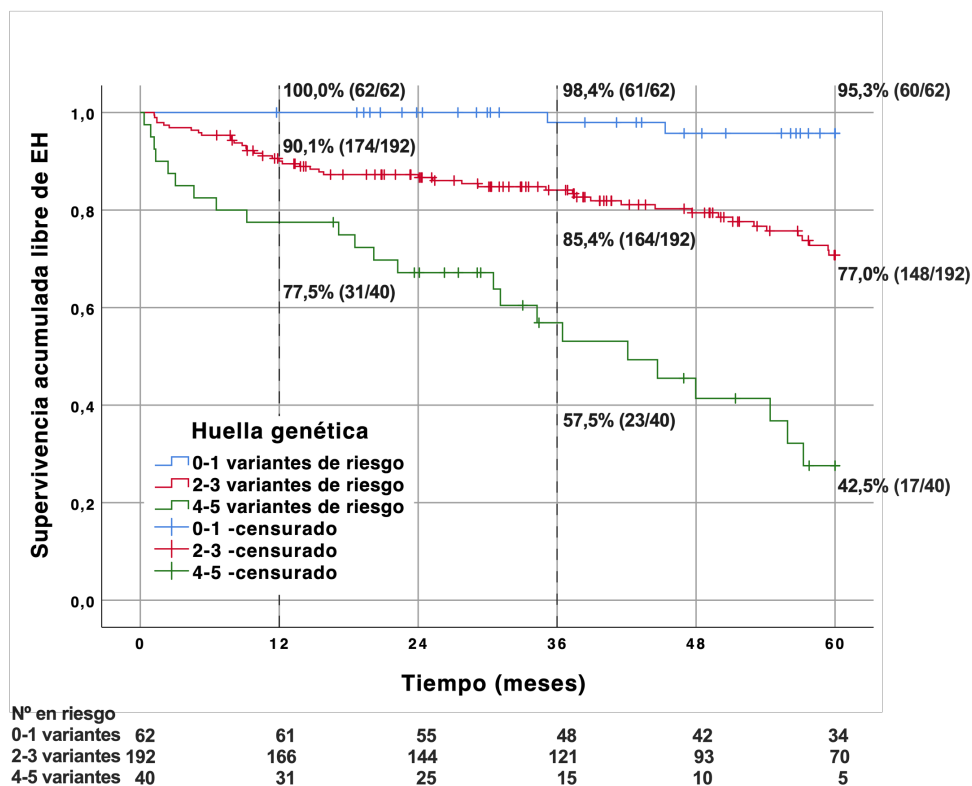


Figura 10. Supervivencia acumulada libre de EH para la combinación de variantes (huella genética).

Paralelamente, a través de la inclusión de la huella genética en el modelo de regresión en lugar de cada una de las variantes de manera independiente, pudimos calcular el sHR de los grupos de riesgo (Tabla 24).

Tabla 24. *Análisis multivariante de acuerdo al desarrollo de EH a cinco años en la cohorte de estimación usando la combinación de variantes como variable “huella genética”.*

Variable	sHR	IC 95%	p-valor
Sexo masculino	0,839	0,487-1,445	0,959
Edad	1,007	0,979-1,035	0,176
Índice MELD	1,130	1,063-1,200	0,001
EH previa (Sí)	2,159	1,161-4,016	0,015
AST (UI/L)	1,002	0,997-1,008	0,377
Plaquetas (x 10⁹/L)	0,999	0,994-1,006	0,937
Albúmina (g/L)	0,889	0,848-0,931	<0,001
Huella genética			
Riesgo intermedio	6,488	1,83-22,927	0,004
Riesgo alto	27,019	7,545-96,753	<0,001

La probabilidad de concordancia, medida según el índice C de Harrell tras el análisis de regresión de este modelo, fue de 0,815.

5.7 Validación huella genética

5.7.1 Cohorte de validación externa

La validación de los resultados se llevó a cabo en una cohorte de pacientes independiente, procedentes de dos hospitales distintos. De los 287 pacientes elegibles que aceptaron participar, 144 fueron excluidos del estudio (79 Child-Pugh C, 65 por seguimiento inferior a 6 meses) por no cumplir con los criterios. De las muestras genotipadas, 3 se eliminaron de análisis posteriores debido a un *Sample call rate* inferior a lo previamente estipulado (Figura S1, Anexo: material suplementario). Las características

de los pacientes, así como las diferencias con la cohorte de estimación, se reflejan en la Tabla 25.

Tabla 25. *Características basales de los pacientes en la cohorte de validación y comparativa con la cohorte de estimación.*

Variable	Cohorte de estimación (n=294)	Cohorte de validación (n=140)	p-valor
Edad ± DE (años)	56,8 ± 10,1	64,1 ± 12,7	<0,001
Sexo masculino	72,1% (212/294)	58,6% (82/140)	0,006
Etiología			0,452
Alcohol	50,3% (148/294)	48,6% (68/140)	
Virus	39,4% (116/294)	37,1% (52/140)	
Otros	10,2% (30/294)	14,3% (20/140)	
Índice Child-Pugh, A	74,8% (220/294)	13,6% (19/140)	<0,001
Índice MELD ± DE	10,0 ± 3,3	13,6 ± 5,2	<0,001
EH previa	12,2% (36/294)	30,0% (42/140)	<0,001
Albúmina ± DE (g/L)	39,5 ± 6,3	29,8 ± 4,9	<0,001
Bilirrubina ± DE (mg/dL)	1,46 ± 1,13	1,98 ± 1,92	0,011
Plaquetas ± DE (x 10⁹/L)	121,5 ± 70,9	126,4 ± 75,7	0,972
Creatinina ± DE (mg/dL)	0,89 ± 0,26	1,06 ± 0,57	0,035
AST ± DE (UI/L)	53,4 ± 42,3	58,3 ± 45,1	0,043
ALT ± DE (UI/L)	44,3 ± 36,7	34,4 ± 28,5	0,002
Sodio ± DE (mmol/L)	139,8 ± 3,3	136,3 ± 6,3	<0,001
INR ± DE	1,21 ± 0,26	1,40 ± 0,41	<0,001
Leucocitos ± DE (cels/x 10⁹/L)	5,69 ± 2,18	7,35 ± 5,59	0,040
Trasplante Hepático	9,1% (27/294)	10,0% (14/140)	0,760
Éxito	24,8% (73/294)	45,7% (64/140)	<0,001
Causa hepática	73,9% (54/73)	78,1% (50/64)	0,547

De manera similar a lo expuesto anteriormente, se estimó la supervivencia acumulada libre de EH en la cohorte de validación en función

de la huella genética extraída de los resultados previos. Así, podemos observar como los grupos de bajo, medio y alto riesgo se siguen segregando de manera diferencial, con una comparativa entre las curvas estadísticamente significativa a uno (log-Rank 12,141; $p<0,002$), tres (log-Rank 12,195; $p=0,002$) y cinco años (log-Rank 13,2; $p<0,001$) (Figura 11).

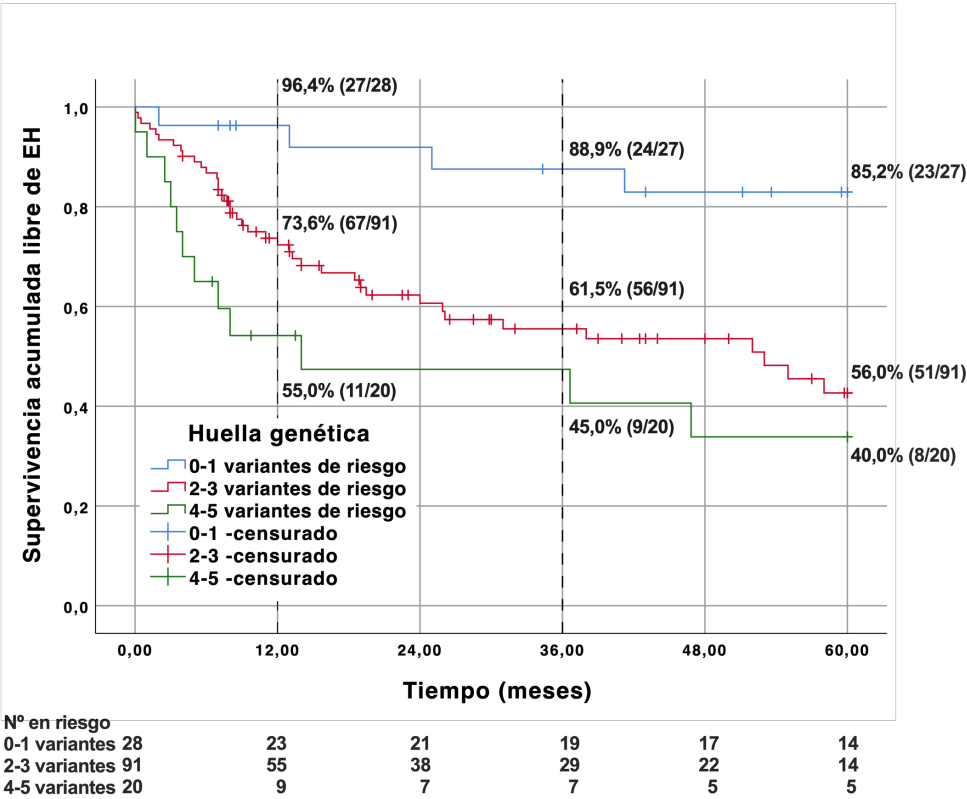


Figura 11. Supervivencia acumulada libre de EH para la combinación de variantes (“huella genética”) en la cohorte de validación.

Más aún, observamos que, siguiendo el mismo modelo de regresión aplicado en la cohorte de estimación, se confirmó la asociación de la huella genética de manera independiente a otras variables (Tabla 26).

Tabla 26. *Análisis multivariante de acuerdo al desarrollo de EH a cinco años en la cohorte de estimación usando la combinación de variantes como variable “huella genética” en la cohorte de validación.*

Variable	sHR	IC 95%	p-valor
Sexo masculino	0,930	0,482-1,794	0,831
Edad	1,029	1,002-1,057	0,039
Índice MELD	1,024	0,965-1,087	0,431
EH previa (Sí)	3,517	1,945-6,357	<0,001
AST (UI/L)	1,002	0,998-1,007	0,338
Plaquetas (x 10⁹/L)	0,999	0,995-1,005	0,985
Albúmina (g/L)	0,995	0,932-1,062	0,890
Huella genética			
Riesgo intermedio	4,155	1,210-14,264	0,024
Riesgo alto	10,017	2,736-36,675	<0,001

La probabilidad de concordancia, medida según el índice C de Harrell tras el análisis de regresión del modelo, fue en este caso de 0,775.

5.7.2 Independencia de otros factores de riesgo

A pesar de que el análisis descrito en apartados anteriores nos demuestra la asociación de la huella genética con el desarrollo de EH a cinco años de manera independiente a otras variables, se estudió el rendimiento de la misma respecto de factores de riesgo conocidos. En las tablas 27 y 28 se muestran las características basales de los pacientes en función al riesgo individual que poseen según la huella genética en las cohortes de estimación y validación, respectivamente.

Tabla 27. Características basales la cohorte de estimación en base a los grupos de riesgo establecidos por la huella genética.

Variable	Riesgo Bajo (n=62)	Riesgo Intermedio (n=192)	Riesgo Alto (n=40)	p-valor
Edad ± DE (años)	56,2 ± 10,1	57,0 ± 10,2	56,8 ± 10,1	0,849
Sexo masculino	72,6% (45/62)	71,9% (138/192)	72,5% (29/40)	0,982
Etiología				
Alcohol	56,5% (35/62)	50,8% (97/192)	40,0% (16/40)	
Virus	32,3% (20/62)	39,4% (76/192)	50,0% (20/40)	
Otros	11,3% (7/62)	9,8% (19/192)	10,0% (4/40)	0,500
Índice Child-Pugh, A	77,4% (48/62)	76,5% (147/192)	62,5% (25/40)	0,165
Índice MELD ± DE	9,5 ± 2,9	10,1 ± 3,3	10,7 ± 3,9	0,235
EH previa	16,1% (10/62)	10,9% (21/192)	12,5% (5/40)	0,546
Albúmina ± DE (g/L)	39,7 ± 6,3	39,8 ± 5,9	37,9 ± 7,6	0,232
Bilirrubina ± DE (mg/dL)	1,23 ± 0,78	1,46 ± 1,19	1,81 ± 1,25	0,039
Plaquetas ± DE (x 10⁹/L)	120,2 ± 56,0	127,8 ± 79,0	93,9 ± 38,4	0,024
Creatinina ± DE (mg/dL)	0,90 ± 0,21	0,88 ± 0,24	0,92 ± 0,40	0,624
AST ± DE (UI/L)	46,2 ± 28,3	51,8 ± 42,5	72,9 ± 53,4	0,007
ALT ± DE (UI/L)	38,3 ± 25,2	43,9 ± 39,1	56,1 ± 38,1	0,067
Sodio ± DE (mmol/L)	140,5 ± 2,8	139,5 ± 3,5	140,3 ± 2,9	0,122
INR ± DE	1,21 ± 0,25	1,22 ± 0,28	1,22 ± 0,26	0,992
Leucocitos ± DE (cels/x 10⁹/L)	5,87 ± 2,28	5,78 ± 2,20	4,87 ± 1,65	0,110
Trasplante Hepático	8,1% (5/62)	7,8% (15/192)	17,5% (7/40)	0,144
Éxitus	17,7% (11/62)	25,9% (50/192)	30,0% (12/40)	0,306
Causa hepática	45,5% (5/11)	76,0% (38/50)	91,7% (11/12)	0,029

Tabla 28. Características basales la cohorte de validación en base a los grupos de riesgo establecidos por la huella genética.

Variable	Riesgo Bajo (n=28)	Riesgo Intermedio (n=91)	Riesgo Alto (n=20)	p-valor
Edad ± DE (años)	57,5 ± 11,5	65,9 ± 11,9	65,0 ± 15,7	0,018
Sexo masculino	57,1% (16/28)	60,4% (55/91)	50,0% (10/20)	0,686
Etiología				
Alcohol	67,9% (19/28)	44,0% (40/91)	45,0% (9/20)	
Virus	21,4% (6/28)	40,7% (37/91)	40,0% (8/20)	
Otros	10,7% (3/28)	15,4% (14/91)	15,0% (3/20)	0,274
Índice Child-Pugh, A	7,1% (2/28)	14,3% (13/91)	20,0% (4/20)	0,423
Índice MELD ± DE	14,2 ± 5,4	13,7 ± 5,7	11,8 ± 4,2	0,272
EH previa	28,6% (8/28)	30,8% (28/91)	30,0% (6/20)	0,976
Albúmina ± DE (g/L)	30,7 ± 4,8	29,7 ± 4,9	28,9 ± 5,0	0,453
Bilirrubina ± DE (mg/dL)	2,78 ± 3,35	1,75 ± 1,28	1,75 ± 1,36	0,022
Plaquetas ± DE (x 10 ⁹ /L)	127,8 ± 87,7	123,5 ± 71,6	138,4 ± 80,4	0,728
Creatinina ± DE (mg/dL)	0,96 ± 0,41	1,08 ± 0,61	1,08 ± 0,58	0,598
AST ± DE (UI/L)	57,5 ± 37,6	56,4 ± 38,3	68,8 ± 77,3	0,552
ALT ± DE (UI/L)	30,9 ± 21,0	35,5 ± 28,2	34,9 ± 39,2	0,758
Sodio ± DE (mmol/L)	137,2 ± 3,7	136,4 ± 6,7	134,5 ± 7,3	0,448
INR ± DE	1,41 ± 0,33	1,41 ± 0,46	1,42 ± 0,26	0,988
Leucocitos ± DE (cels/x 10 ⁹ /L)	8,44 ± 7,67	7,27 ± 5,24	7,36 ± 3,58	0,627
Trasplante Hepático	11,1% (3/27)	9,9% (9/91)	5,0% (1/20)	0,751
Éxitus	37,0% (10/27)	51,6% (47/91)	35,0% (7/20)	0,223
Causa hepática	90,0% (9/10)	82,6% (38/46)	57,1% (4/7)	0,242

Además, pudimos observar como, independientemente del grado de disfunción hepática basal medido por Child-Pugh (Estimación: Child-Pugh A log-Rank 16,5; p<0,001/ Child-Pugh B log-Rank 25,5; p<0,001. Validación: Child-Pugh A log-Rank 1,3; p>0,05/ Child-Pugh B log-Rank 13,1; p<0,001) (Figura 12) o MELD (Estimación: MELD≤10 log-Rank

24,7; $p<0,001$ / MELD $>10<15$ log-Rank 15,3; $p<0,001$ / MELD >15 log-Rank 8,4; $p=0,015$. Validación: MELD ≤ 10 log-Rank 8,6; $p=0,014$ / MELD $>10<15$ log-Rank 7,6; $p<0,023$ / MELD >15 log-Rank 1,9; $p=0,390$) (Figura 13), la huella genética seguía discriminando grupos de pacientes con bajo, intermedio y alto riesgo en ambas cohortes.

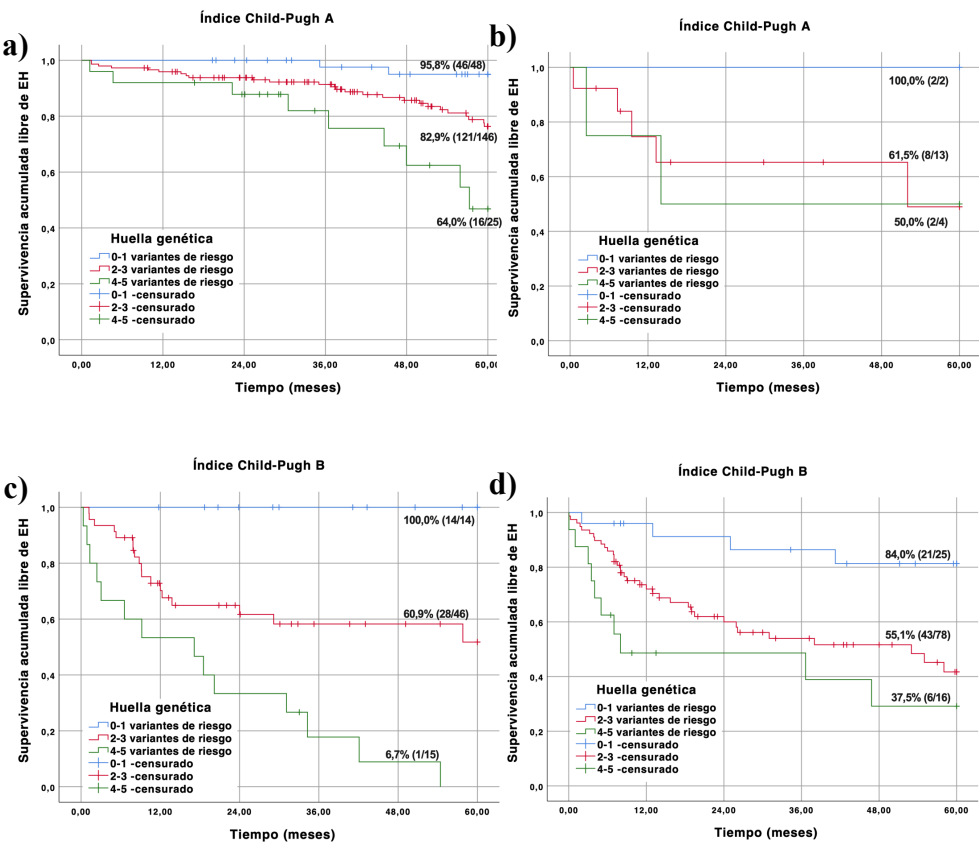


Figura 12. Supervivencia acumulada libre de EH para la huella genética en función del grado de disfunción hepática según el índice Child-Pugh A (a y b) o B (c y d), en las cohortes de estimación (a y c) y validación (b y d).

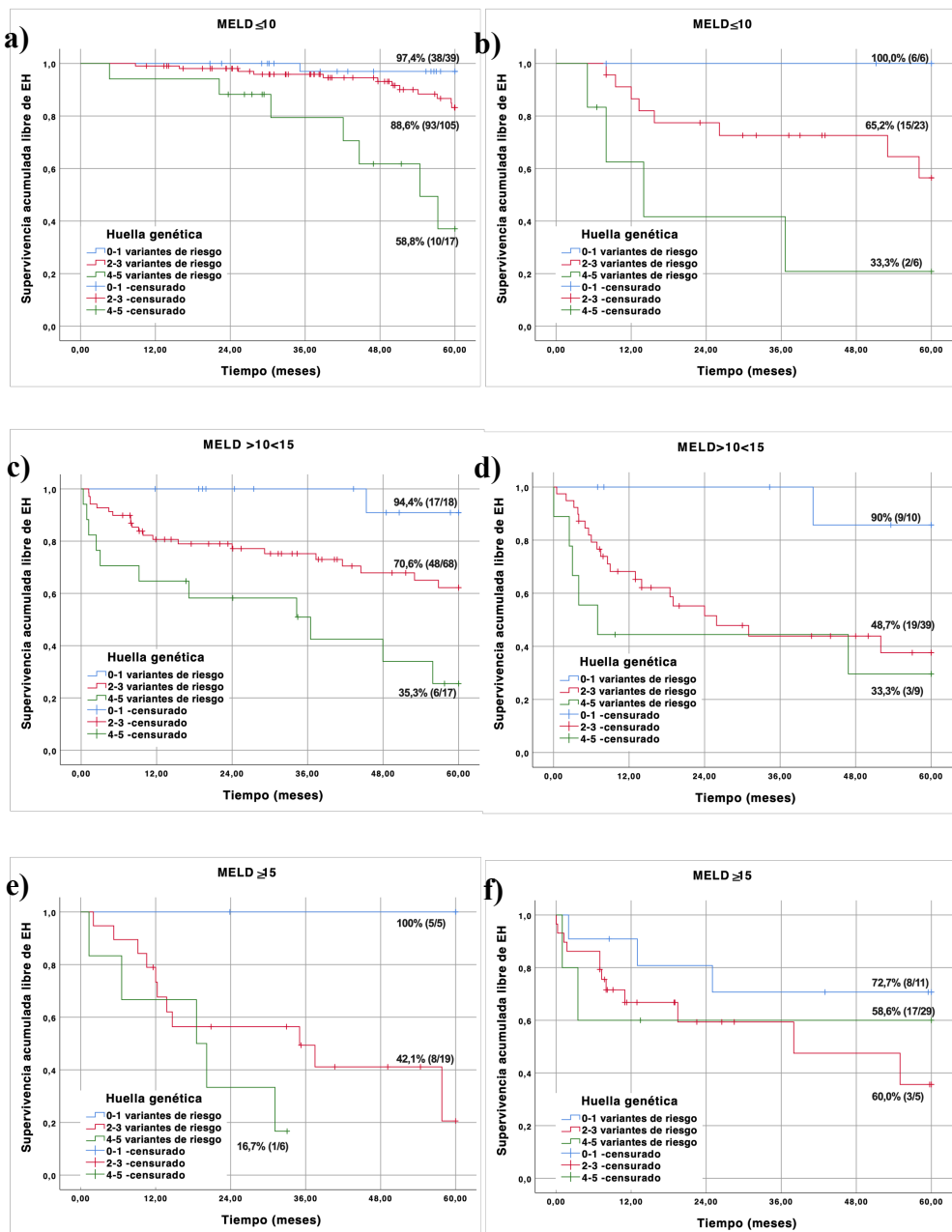


Figura 13. Supervivencia acumulada libre de EH para la huella genética en función del grado de disfunción hepática según el índice MELD:

≤ 10 (a y b), $>10 < 15$ (c y d) y ≥ 15 (e y f) en las cohortes de estimación (a, c y e) y validación (b, d y f).

De la misma manera, demostramos que el rendimiento de la huella genética era independiente de haber sufrido episodios de EH en las dos cohortes (sin EH previa: log-Rank 40,7; $p < 0,001$ y log-Rank 6,6; $p = 0,037$ en las cohortes de estimación y validación, respectivamente. En pacientes con EH previa: log-Rank 8,8; $p = 0,012$ y log-Rank 14,9; $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 14).

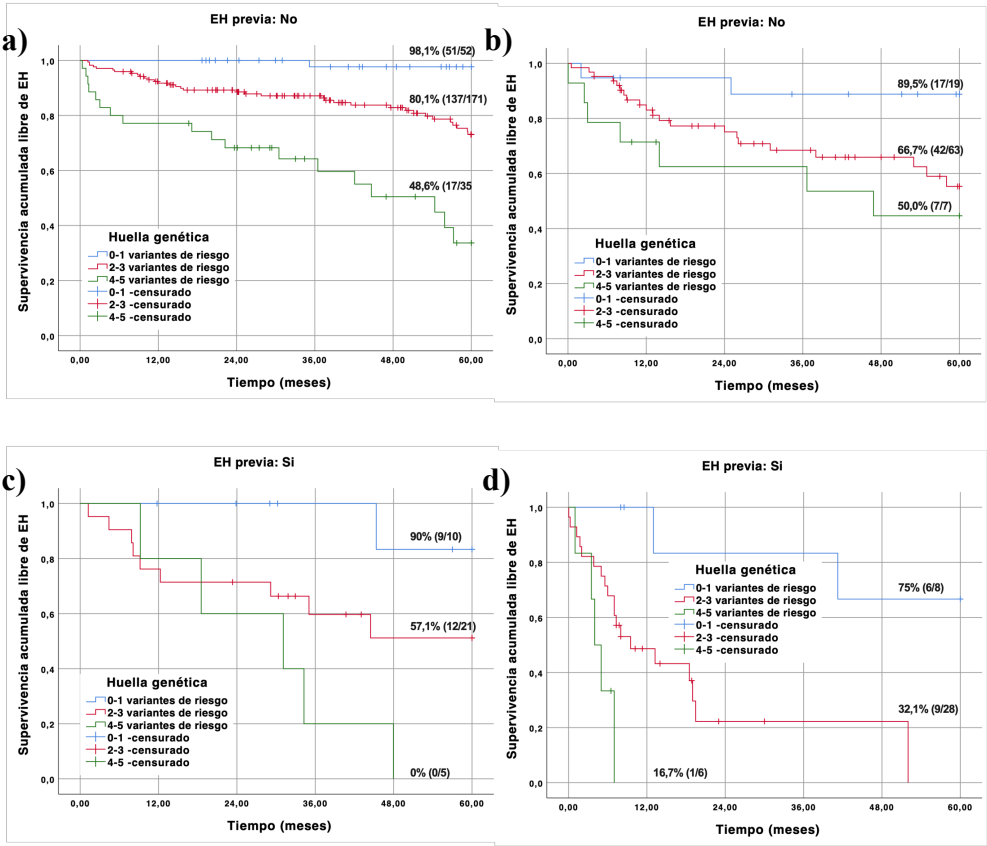


Figura 14. Supervivencia acumulada libre de EH para la huella genética en función de la presencia (c y d) o no (a y b) de eventos de EH previo al estudio en las cohortes de estimación (a y c) y validación (b y d).

Igualmente, la huella genética también permitió la discriminación de grupos de bajo, intermedio y alto riesgo de EH de manera independiente a la presencia de EH mínima, medida bien por FCP (≥ 39 Hz: log-Rank 18,1 $p < 0,001$ / < 39 Hz log-Rank 20,2; $p < 0,001$) o por las pruebas PHES (≥ -4 : log-Rank 15,5; $p < 0,001$ / < -4 : log-Rank 26,6; $p < 0,001$) (Figuras 15 y 16).

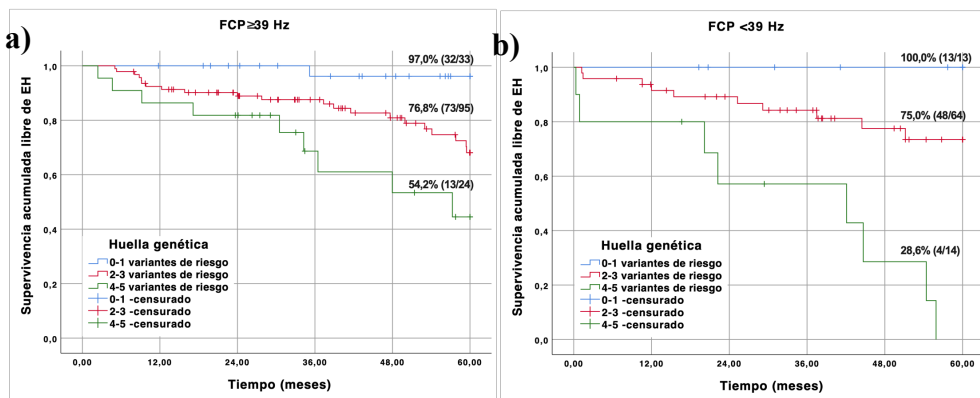


Figura 15. Supervivencia acumulada libre de EH para la huella genética en base al diagnóstico de EH mínima según la FCP.

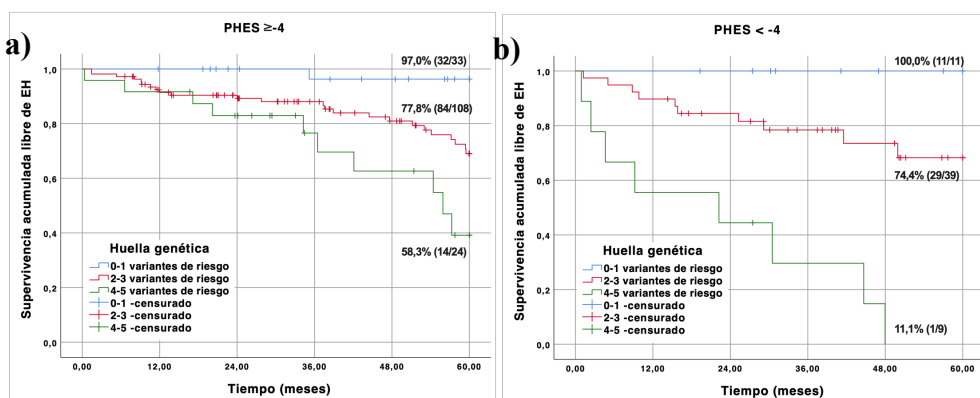


Figura 16. Supervivencia acumulada libre de EH para la huella genética en base al diagnóstico de EH mínima según PHES.

Finalmente, demostramos también que la huella genética tiene un rendimiento independiente de una prueba fisiológica como la SOG (Basal <79 µg/dL log-Rank 11,5; p=0,003/ Basal ≥ 79 µg/dL log-Rank 28,0; p<0,001. Delta <33 µg/dL log-Rank 9,3; p=0,01/ Delta ≥ 33µg/dL log-Rank 35,1; p<0,001) (Figura 17).

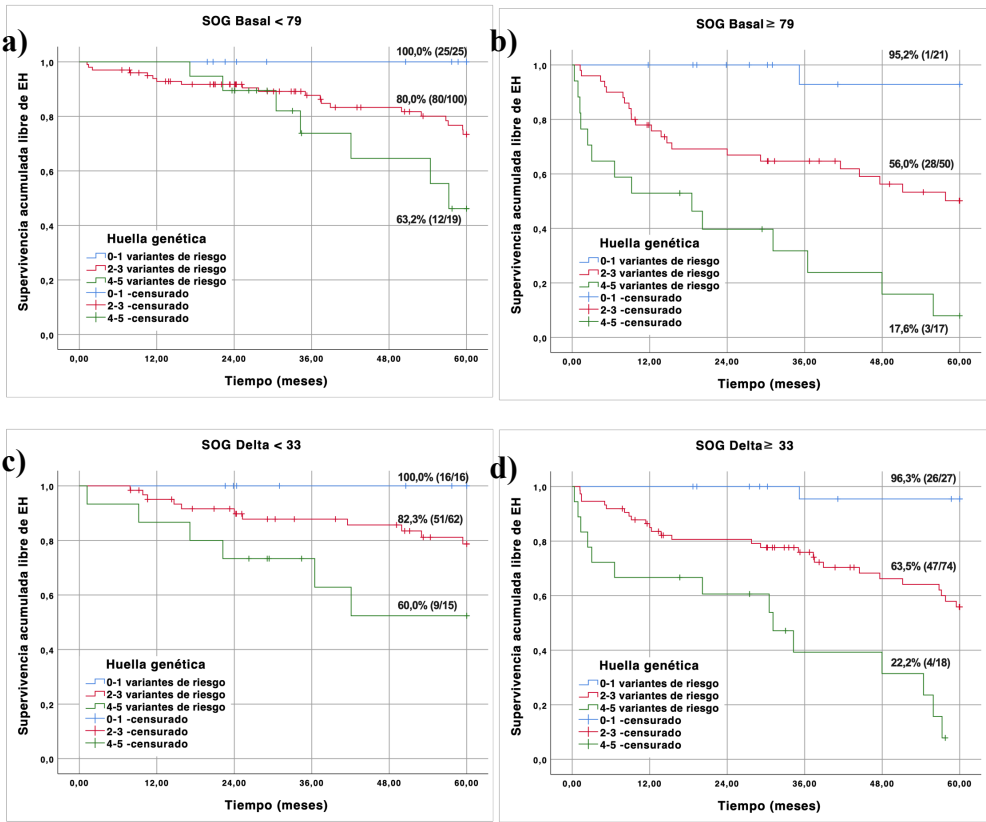


Figura 17. Supervivencia acumulada libre de EH para la huella genética en base a la respuesta a la SOG. Amonio basal a) <79 µg/dL, b) ≥79 µg/dL. Incremento de los niveles de amonio a 60 minutos (Delta) c) <33 µg/dL, d) ≥33 µg/dL.

5.8 Análisis funcional *in silico* de las variantes asociadas a EH

5.8.1 NC_000019.10:g.46784682T>C

Esta variante (ID: rs313853) se encuentra en el cromosoma 19, en la región de influencia del gen *SLC1A5*, que codifica para un transportador de aminoácidos dependiente de sodio (ATB(0)). Se define por un cambio T>C y, para los transcritos que se han definido hasta la fecha, puede tener una consecuencia bien a nivel intrónico o a nivel del 5' UTR. La expresión de este gen no es mayoritaria entre los tejidos del eje intestino-hígado-cerebro, pero numerosas publicaciones han demostrado que sus niveles aumentan en diversas condiciones (237). En concreto, los datos revelan que su expresión se ve incrementada cuando los requerimientos celulares de glutamina son mayores para dar soporte a las necesidades de precursores o de obtención de energía a través de la glutaminólisis; en cualquier caso, rutas productoras de amonio.

Según los datos disponibles, no se detectó ningún eQTL significativo para la variante. No obstante, descubrimos que se encontraba en alto desequilibrio de ligamiento en población CEU (1000GENOMES:phase_3) con la variante rs313836 ($r^2=1,000$; $D'=1,000$), a 5.309 pb de distancia. Analizando esta última comprobamos que se asocia con los sitios de unión de hsa-miR-122a y hsa-miR-137, dos miARNs que regulan a nivel epigenético la expresión de este gen (Figura 18).

5.8.3 NC_000003.12:g.52226766A>G

Esta variante (ID: rs5743836) en el cromosoma 3 se encuentra en la región de influencia del gen *TLR9* (Toll-like receptor 9), un receptor de reconocimiento de patrones que juega un papel crucial en la activación y la homeostasis del sistema inmune tras la detección de patógenos. Este gen se expresa mayoritariamente en células del sistema inmune tales como macrófagos, *natural killer*, dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, manifestándose además en órganos como el cerebro, el bazo o el intestino delgado. Concretamente, este receptor activa el sistema inmune innato al reconocer motivos CpG de ADN sin metilar, que identifica como ADN extraño. En los últimos años se han reportado diversas variantes en este gen que se asocian con una mayor predisposición a linfoma tipo Hodgkin, así como a enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas como el asma o la enfermedad de Crohn.

Según los datos disponibles, esta variante se produce en la región 2Kb *Upstream* del gen, identificándose como eQTL para diversos tejidos, tanto esta, como otras variantes en elevado desequilibrio de ligamiento (Figura 21).

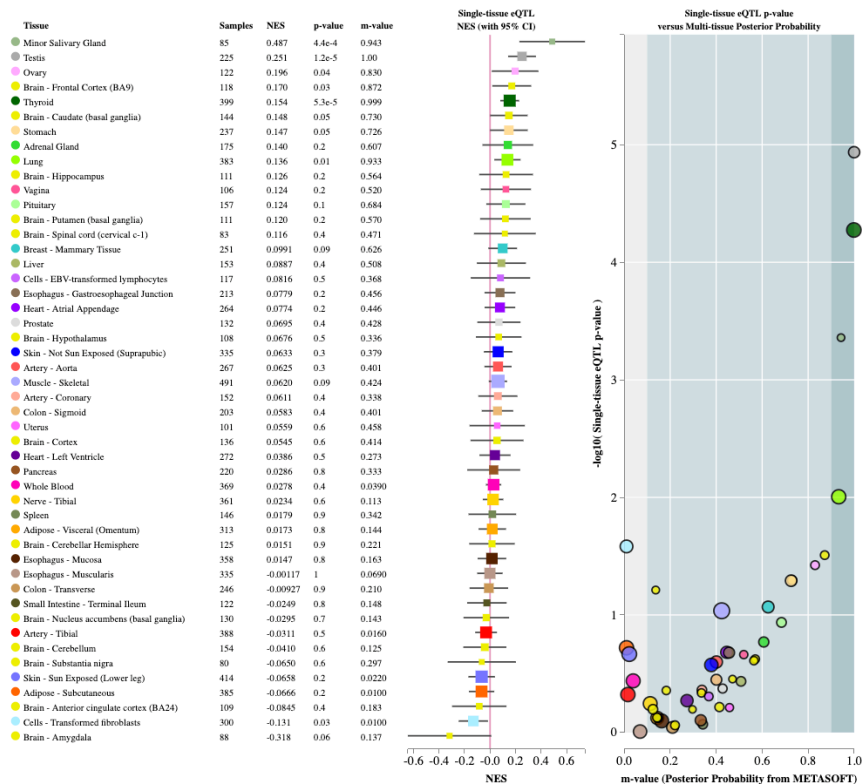


Figura 21. Comparación eQTL multi-tejido para la variante NC_000003.12:g 52226766A>G. Fuente: GTEx Analysis Release V7 (dbGaP Accession phs000424.v7.p2).

De manera más llamativa, observamos que el alelo G de esta variante genera varios sitios de regulación, tal y como muestra la Tabla 29. Además, se ha demostrado recientemente que se genera también un elemento de respuesta a IL-6, el cual aumentará la expresión de *TLR9* a través de STAT3, llevando a una respuesta celular exacerbada frente a CpG (238).

Tabla 29. Predicción de los sitios de regulación generados por la presencia de la variante NC_000003.12:g 52226766A>G.

Binding matrix	Allele	Consequence	Transcription factors	Motif position	High information position	Motif score change
ENSPFM0179	G	TF binding site	ETV7::TBX21	1 (out of 22)	No	More like consensus sequence
ENSPFM0206	G	TF binding site	ETV2::FOXJ1, ELK1::FOXJ1, ERF::FOXJ1, FOXO1::ELK1, FLI1::FOXJ1, ETV5::FOXJ1, FOXO1::ELK3, FOXO1::ETV4, ETV5::FOXO1, ETV2::FOXO6, FOXO1::ETV1	12 (out of 13)	No	Less like consensus sequence
ENSPFM0305	G	TF binding site	HOXB2::ELF1	6 (out of 22)	Yes	Less like consensus sequence
ENSPFM0119	G	TF binding site	HOXD12::ETV1, HOXD12::ETV4, HOXD12::ELK1	2 (out of 17)	No	More like consensus sequence
ENSPFM0438	G	TF binding site	PBX4::HOXA10	4 (out of 15)	No	Less like consensus sequence
ENSPFM0442	G	TF binding site	PITX1::HES7	15 (out of 15)	Yes	Less like consensus sequence
ENSPFM0455	G	TF binding site	POU2F1::EOMES	3 (out of 30)	No	Less like consensus sequence
ENSPFM0504	G	TF binding site	SPDEF	1 (out of 16)	No	More like consensus sequence

5.8.4 NC_000019.10:g.48703417G>A

Esta variante (ID: rs601338) se encuentra en la región codificante del gen *FUT2*, que produce la enzima Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 2 (EC:2.4.1.344). Esta enzima media la adición de fucosa a la galactosa terminal de cadenas de polisacáridos en glucoproteínas y glucolípidos de membrana, resultando un epítipo que juega un papel esencial en la comunicación intercelular y la interacción microbio-hospedador. Además, esta enzima regula la expresión de los antígenos de los grupos sanguíneos Lewis y ABO (H) en la superficie de las células epiteliales y en las secreciones de fluidos corporales.

En concreto, esta mutación de cambio de sentido introduce un codón de STOP en la secuencia aminoacídica de los tres transcritos a los que puede llegar a afectar, produciendo en cualquier caso una proteína aberrante (Tabla 30). De manera consecuente, se ha relacionado con el fenotipo SECRETOR/NONSECRETOR (OMIM: 182100), el cual ha sido asociado con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes (psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o síndrome de Sjogren, entre otras) y de infección con diversos microorganismos;

además, se ha demostrado recientemente que juega un papel en la composición de la microbiota intestinal así como en la homeostasis de distintos metabolitos en circulación (ej. Colesterol, vitamina B12).

Tabla 30. *Predicción de la consecuencia producida por la presencia de la variable en estudio.*

<i>Transcript (strand)</i>	<i>Allele (Tr. allele)</i>		<i>Consequence Type</i>	<i>Position in transcript</i>	<i>Position in CDS</i>	<i>Position in protein</i>	<i>AA</i>	<i>Codons</i>
ENST00000425340.2 (+) biotype: protein_coding	A	(A)	stop gained	578 (out of 3111)	461 (out of 1032)	154 (out of 343)	W/*	TGG/TAG
ENST00000522966.1 (+) biotype: protein_coding	A	(A)	stop gained	572 (out of 771)	461 (out of 660)	154 (out of 220)	W/*	TGG/TAG
ENST00000391876.5 (+) biotype: protein_coding	A	(A)	stop gained	504 (out of 1593)	461 (out of 1032)	154 (out of 343)	W/*	TGG/TAG

5.9 Utilidad de la metodología de genotipado de alto rendimiento

5.9.1 Análisis de la eficiencia

Las cuatro variantes genotipadas en la plataforma LightCycler consiguieron una tasa de éxito en el genotipado, medida por el *Assay call rate* superior al 98% [mediana (máx-min). 99,14 (98,29-99,57)] mientras que en la evaluación por matrices en la plataforma OpenArray se observó alguna variante con una tasa de éxito por debajo de 90%, el límite inferior propuesto en el control de calidad, con una mediana de 98,30 (83,4-100); p<0,05 (Figura 22).

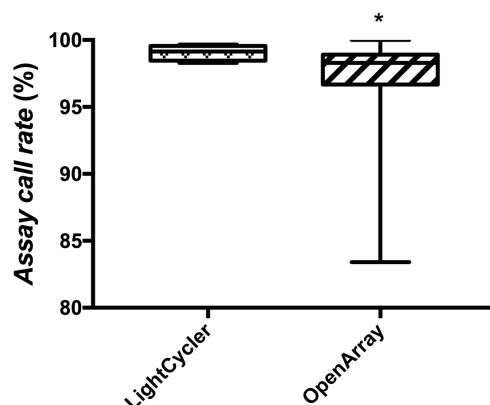


Figura 22. Tasa de éxito en el genotipado según la plataforma medido por el parámetro *Assay call rate*.

Sin embargo, ante estas diferencias en la eficiencia de la plataforma, y a fin de identificar el/los posibles factores determinantes, decidimos analizar la eficiencia en función a la calidad del ADN de las muestras. De esta manera, pudimos observar diferencias estadísticamente significativas respecto del *Assay call rate* en la plataforma OpenArray al clasificar las muestras en función del *ratio* de absorbancia 260/230 $<1,2$ o $\geq 1,2$ [97,4 (73,3-99,1) vs. 100 (92,3-100); $p<0,0001$] (Figura 23).

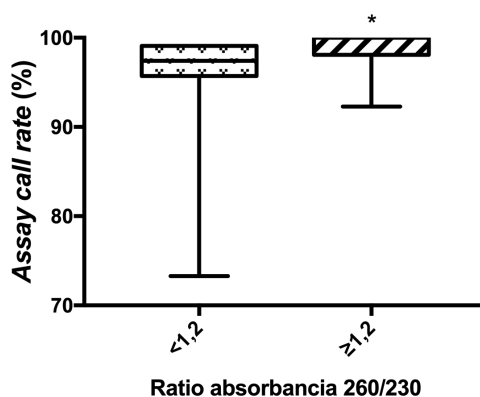


Figura 23. Tasa de éxito en el genotipado según la calidad del ADN medida por el *ratio* de absorbancia 260/230 en los ensayos llevados a cabo en OpenArray.

5.9.2 Análisis del coste

Para el cálculo del coste no se tuvieron en cuenta los gastos dependientes de la preparación de la muestra, que abarcan desde la extracción de sangre, procesado y almacenamiento a la extracción y cuantificación del ADN, ya que estos procedimientos se consideraron comunes al análisis por las dos plataformas (descrito en la sección 4.2).

Los costes incluidos fueron únicamente en concepto de sondas (o matrices, en su caso), *Mastermix* (mezcla de reacción comercial) y fungibles (puntas y placas de 96 pocillos). Se tuvieron en cuenta los precios disponibles en nuestra región en el año 2018 para el análisis de hasta 60 ensayos (los SNPs seleccionados en este estudio) en un número de hasta 960 pacientes (el pedido mínimo de matrices personalizadas para OpenArray). No se incluyó tampoco ningún coste por uso, alquiler, o adquisición de los equipamientos.

Para el análisis de 60 polimorfismos, el coste total estimado en la plataforma LightCycler aumentó de manera progresiva no lineal en función del número de muestras, desde 25589,05€ para 1 muestra hasta 160689,80€ para 960. Sin embargo, el coste de las matrices personalizadas (y los reactivos y fungibles necesarios para las reacciones) para la plataforma OpenArray se mantuvo estable en 8337,87€, independientemente del número de muestras. Más aun, el precio por muestra (excluyendo los gastos

anteriormente mencionados) osciló entre 25589,05€ y 167,39€ en el primer caso, y entre 8337,37€ y 8,69€ en el segundo (Figura 24).

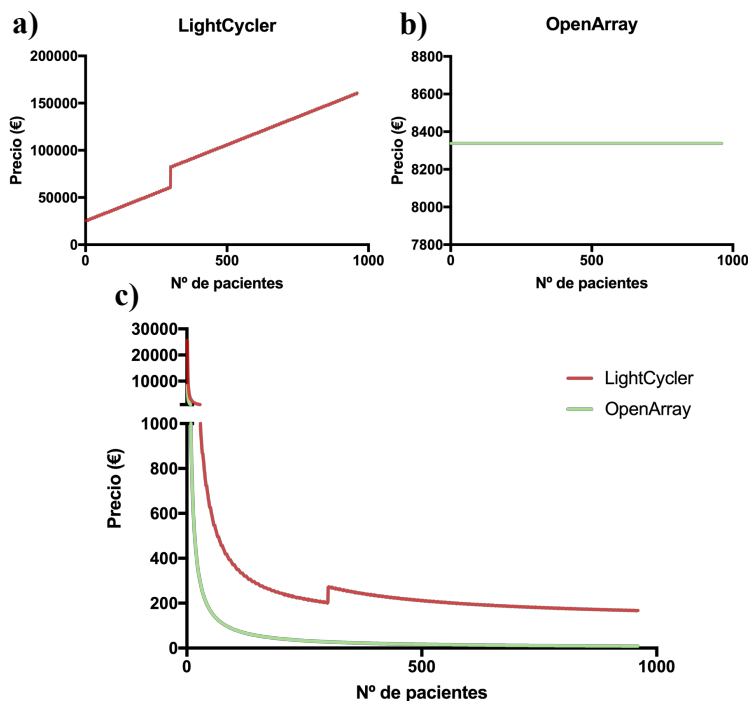


Figura 24. Estimación del precio total para 60 ensayos en función del número de muestras para las plataformas a) LightCycler y b) OpenArray. c) Cálculo del precio por ensayo según el número de muestras.

El coste en función del número de polimorfismos en la plataforma LightCycler, para el análisis de 960 muestras, se estimó que presentaba variaciones lineales entre los 2744,10€ para 1 y 164646,00€ para 60 ensayos. De manera similar, la estimación para la plataforma OpenArray presentó variaciones, dependiendo del tipo de matriz necesaria, que oscilaron entre los 3034,97€ hasta los 8337,87€ (Figura 25).

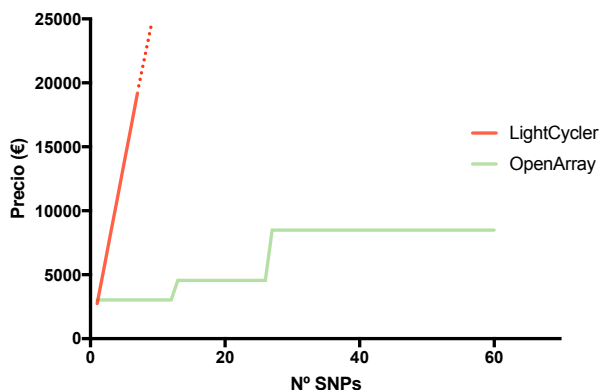


Figura 25. Estimación del coste del estudio en función del número de ensayos.

5.9.3 Análisis del tiempo

El análisis del tiempo se llevó a cabo en dos fases: tiempo de reacción y tiempo de análisis. En el primer caso, teniendo en cuenta un tiempo aproximado de preparación por placa de 20 minutos, y de 1 hora y 28 minutos por cada reacción de PCR, se estimó un máximo de 4 reacciones por cada día de trabajo (jornadas de 8 horas) en la plataforma LightCycler. De manera similar, la estimación para OpenArray fue de 8 reacciones y lecturas de matrices/día de trabajo.

Así, se calculó que, para el análisis del mismo número de muestras y ensayos planteados anteriormente, usando el equipo LightCycler se necesitaría un tiempo que podría alcanzar los 150 días laborables mientras que en OpenArray el tiempo oscilaría entre 1,25 y 2,5 días de trabajo en función del número de ensayos (no depende en este caso del número de muestras) y, por tanto, del tipo de matriz seleccionada (Figura 26).

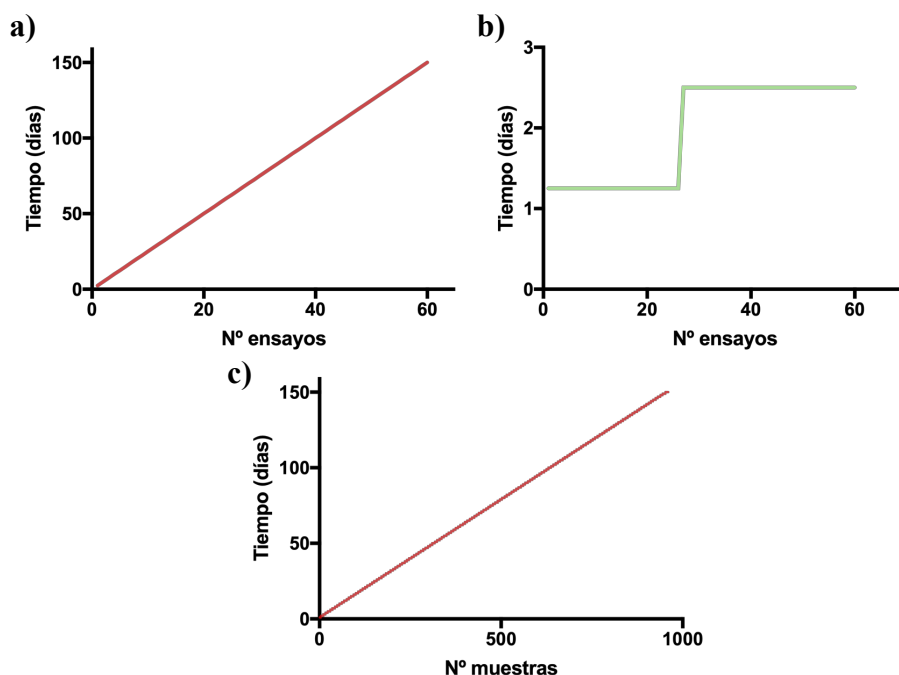


Figura 26. Estimación del tiempo empleado en el estudio usando LightCycler en función del a) número de ensayos y c) número de muestras. b) Estimación usando OpenArray.

Respecto del tiempo de análisis, estimando una duración aproximada de 10 minutos para el análisis de cada placa de reacción, se calculó que, dependiendo del número de ensayos y muestras, se necesitaría un tiempo de hasta 12,5 días para realizar el análisis con *LightCycler 96 Application Software*. Sin embargo, y teniendo en cuenta una duración aproximada de 15 minutos para el análisis, el tiempo estimado para el análisis usando el *software Genotyping* con la plataforma OpenArray podría oscilar entre 15 minutos y 1,9 días, en función del número de ensayos, y de manera independiente al número de muestras ya que el *software* permite la integración de distintas matrices para un mismo análisis.

6 DISCUSIÓN

6.1 Huella genética

Diversos factores clínicos se han asociado al riesgo de desarrollar encefalopatía hepática en pacientes con cirrosis; no obstante, el papel que la variabilidad genética interindividuo puede tener sobre este riesgo ha ido ganando interés en los últimos tiempos. El principal hallazgo de este trabajo es la asociación de distintas variantes genéticas con el desarrollo de eventos de EH, previa identificación de genes con potencial implicación en la enfermedad, y la definición de grupos de pacientes en base al riesgo individual según el genotipo. En los últimos años, diversos factores genéticos han sido objeto de estudio a fin de aumentar el conocimiento de los mecanismos reguladores de la progresión de la enfermedad hepática. Como ejemplo de relevancia, la asociación de la variante NC_000022.10:g.44324727C>G (ID: rs738409) en el gen *PNPLA3* con la presencia de esteatosis, fibrosis hepática y actividad en el contexto de la EHGNA que, además, ha sido recientemente asociado con un mayor riesgo de descompensación hepática y mortalidad (244). Así, en este trabajo se postula que variantes que pudieran modificar la respuesta inmune, la barrera intestinal, el metabolismo de glutamina/amonio, así como otros procesos implicados en la patogenia de la EH, marcan diferencias en la respuesta individual ante ciertos eventos en la cirrosis. Estas diferencias establecerían una predisposición que a su vez explicaría las diferencias que observamos en la aparición de EH. Sin embargo, hasta la fecha pocos estudios han podido profundizar en esta hipótesis.

Respecto de las asociaciones encontradas, para dos de los SNPs (ID: rs2562582 y rs313853) no se encuentran asociaciones previas en publicaciones indexadas hasta la fecha. No obstante, un total de 72 publicaciones describen una asociación entre la variante en la región de

influencia de *TLR9* (ID: 5743836) y diversas entidades clínicas relacionadas con la inmunidad innata, con infecciones e incluso cáncer. Igualmente, se han reportado asociaciones para la variante ID: rs601338 en 44 publicaciones, sobre todo en relación a variaciones en la composición de la microbiota y enfermedades inflamatorias. Finalmente, las variantes en *GLS* descritas con anterioridad por nuestro grupo (228), han sido validadas en este trabajo. Hace unos años, además, un estudio llevado a cabo en Alemania encontró una relación entre la longitud del microsatélite y la presencia de EH mínima según la FCP, sugiriendo de nuevo el papel de esta variante en el desarrollo de EH (245). Sin embargo, un estudio posterior en pacientes cirróticos del Hospital Universitario de Anam, en Korea, con el objetivo de validar esta asociación, encontró que el carcinoma hepatocelular, etiología alcohólica, el índice MELD, o los niveles de amonio séricos, pero no la longitud del microsatélite en *GLS*, se encontraban asociados al desarrollo de EH (246). Por último, un estudio reciente ha demostrado que diferencias en la longitud de este microsatélite tienen un efecto sobre la expresión del gen y estas se asocian con deficiencias en el desarrollo cerebral, resaltando la relevancia de este *locus* (247).

La asociación encontrada en cada variante, como se expuso previamente, explicaría parte de las diferencias que se observan en la presentación y, a través de la combinación de las mismas se ha conseguido identificar individuos en riesgo de desarrollo de EH. La idea de combinar variantes comunes con un efecto moderado en enfermedades complejas no es nueva, y numerosos estudios han usado esta estrategia para establecer el riesgo individual en distintas enfermedades. De hecho, parece ser que la disponibilidad de nuevas técnicas y la acumulación de datos de estudios de genoma completo han hecho resurgir el concepto de *Polygenic Risk Score*,

a través del cual se estudia la predisposición a enfermedades comunes basándose en múltiples variantes. Por ejemplo, un trabajo reciente ha conseguido estratificar pacientes predispuestos a cinco enfermedades con un gran impacto en la sanidad como: diabetes tipo 2, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer de mama, fibrilación auricular y enfermedad de las arterias coronarias, con un riesgo equivalente al de enfermedades monogénicas (201). Esta metodología, aunque está actualmente siendo discutida y en búsqueda de patrones de estandarización para poder comparar y validar los estudios, se prevé tenga un gran impacto en el desarrollo de la medicina personalizada (248).

6.2 Impacto

La prevalencia global de cirrosis está creciendo de manera notable y la carga que supone esta enfermedad es cada vez mayor, con una tendencia a acelerarse debido, principalmente, a factores relacionados con el estilo de vida en países desarrollados. De entre las complicaciones asociadas a la cirrosis, se considera a la EH la más compleja e incapacitante; se manifiesta en un espectro amplio de severidad, con cambios impredecibles en la función cognitiva y una discapacidad intelectual progresiva. En comparación con los pacientes cirróticos sin EH, incluso aquellos con EH subclínica tienen mayor riesgo de eventos adversos tales como hospitalizaciones, caídas, accidentes, peor calidad de vida y elevada tasa de mortalidad. Más aún, se ha estimado que la mortalidad global a un año después de desarrollar EH puede alcanzar el 60%. Por ello, establecer el riesgo individual de desarrollar EH nos permitiría informar a los pacientes, seguir una monitorización más estrecha e implementar estrategias de

intervención con el objetivo de reducir el riesgo de progresión e incluso disminuir la tasa de eventos adversos. Lamentablemente, en la actualidad hay pocos datos disponibles en relación a la estratificación de los pacientes con cirrosis respecto del riesgo individual de desarrollar EH. En este sentido, varios autores han resaltado, además, la necesidad de crear índices de riesgo como el propuesto en este trabajo, para predecir su aparición (249). Hasta la fecha, la predicción de EH ha sido estimada siguiendo dos grandes vías: mediante la evaluación de los factores de riesgo o bien identificando la presencia de EH mínima/encubierta.

Como se ha expuesto anteriormente, la EH manifiesta puede aparecer debido a una combinación de diversos factores tales como la concentración de amonio, el estado inflamatorio y el transporte de glutamina en el organismo, entre otros. Estos mecanismos pueden considerarse secundarios a otros procesos que se han encontrado asociados al desarrollo de EH y que pueden ser medidos de manera sencilla, permitiéndonos así evaluar los factores de riesgo. De manera resumida, podemos afirmar que, a medida que la disfunción hepática se acentúa, el riesgo de EH aumenta (250). En este sentido, varios estudios han confirmado que índices clínicos, que pueden calcularse con parámetros clínicos y bioquímicos rutinarios, son predictores de EH (251). De manera concordante, nuestros datos muestran una asociación entre el MELD (y otros parámetros bioquímicos indicativos de la disfunción hepática) y el desarrollo de EH. No obstante, varios autores han manifestado su inquietud ante estos resultados ya que algunos estudios, a diferencia de este trabajo, no han tenido en cuenta la aportación de ciertas etiologías o de factores de riesgo bien conocidos como la EH previa o la presencia de EH mínima (252). Para este trabajo, no solo se ha tenido en cuenta el grado de

disfunción hepática, sino que la huella genética aquí obtenida, mantiene su asociación de manera independiente a los índices Child-Pugh o MELD.

Más allá de los índices de función hepática, el grado de hipertensión portal, reflejo de la circulación de sustancias con capacidad neurotóxica desde la circulación esplénica a través de derivaciones porto-sistémicas, se ha asociado de manera independiente con el riesgo de EH (253). Por otro lado, el metabolismo del amonio también se ha asociado con el riesgo de EH; este puede ser evaluado de manera indirecta a través del grado de sarcopenia del paciente usando técnicas de imagen, o analizando los niveles circulantes de amonio durante el test de sobrecarga oral de glutamina (59, 254, 255). Los datos aquí presentados corroboran la asociación entre los niveles de amonio y su metabolismo, mediante el test de SOG, y el desarrollo de EH. No obstante, nuestros datos demuestran que la capacidad predictiva de la huella genética aquí presentada sigue prevaleciendo ante la respuesta a la SOG. Finalmente, el uso de ciertos medicamentos con implicación en la motilidad o producción de amonio intestinal también se ha asociado con el desarrollo de EH e incluso han sido propuestos como biomarcadores para evaluar el riesgo (237, 256).

De manera más frecuente, la identificación de EH mínima/encubierta se ha venido usando para predecir el riesgo de EH. Como se ha introducido anteriormente, existen diversas herramientas disponibles para su evaluación. Sin embargo, y a pesar de las recomendaciones, varios factores dificultan su implementación en la clínica. Tal y como se ha resumido en una revisión reciente llevada a cabo por E. Tapper, en primer lugar, muchos pacientes sin signos de EH encubierta están en riesgo de EH y, aunque su evaluación mejore la identificación de pacientes en riesgo, el porcentaje de pacientes

infradiagnosticados es elevado (257). En este sentido, un estudio ha encontrado que el riesgo de EH a 1 año era del 34% en pacientes con EH encubierta frente al 18% en aquellos que no la tenían (56). Por otro lado, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo excluyendo pacientes concretos, por lo que muchos pacientes en riesgo no serían susceptibles de realizar las pruebas, incluyendo consumidores activos de alcohol o con ciertas medicaciones o comorbilidades. Esto produce un gran salto entre la eficacia y la efectividad de una prueba, y es por ello que hacen falta estrategias basadas en poblaciones para la evaluación de estas pruebas. Más aun, los puntos de corte no están bien establecidos y, aunque las pruebas pudieran mantener su poder predictivo, los resultados no son reproducibles entre los estudios ya que esto limita su validación externa. Además, la selección de los controles para cada estudio varía de un centro a otro y se ha demostrado que algunos factores como la educación, el tabaquismo o ciertas comorbilidades que no se tienen en cuenta en todos los estudios podrían impactar en el resultado de las pruebas (258). Como consecuencia se obtiene una imprecisión en la predicción; tanto así, que el porcentaje de pacientes que desarrollan EH tras el diagnóstico de EH mínima puede oscilar entre el 10% y el 40% (249). Al mismo tiempo, estas diferencias se pueden ver agravadas por la desviación que existe inter-operador a la hora de la interpretación de estas pruebas.

En este sentido, el análisis de la huella genética propuesta en este trabajo presentaría una serie de ventajas respecto a las pruebas diagnósticas de EH mínima para la predicción del desarrollo de EH, ya que se plantea como un biomarcador:

- Robusto, ya que su resultado no dependería de la experiencia del operador, ni del entrenamiento o el estado del paciente. La

metodología es relativamente rápida, simple y con menor coste que otras pruebas. En algunos centros, la determinación de polimorfismos se ha llegado a establecer de manera rutinaria para ciertas condiciones.

- Estable, ya que la genética no cambia a lo largo de la vida del paciente, por lo que el biomarcador permanece estático durante el curso de la enfermedad. Esto lo diferencia de otros parámetros que pueden alterarse por condiciones concretas (medicación, infección, otras descompensaciones...) condicionando el pronóstico del paciente al momento de la medición. Por esto mismo, no necesita ser medido en repetidas ocasiones.

- No invasivo, ya que el ADN se puede extraer de cualquier tipo de muestra biológica que se obtenga del paciente.

Además, esta prueba cumple con la mayoría de los requisitos para que se considere su implementación:

- Es efectiva, debido a que cuenta con una serie de propiedades: 1) Es biológicamente plausible, ya que las variaciones en ciertos genes pueden modificar la expresión y/o la actividad de la proteína para la que codifican que, en este caso, están relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad, pudiendo alterar el curso de la misma. 2) Tiene una elevada sensibilidad y especificidad 3) Su determinación es sencilla, con alta reproducibilidad y baja tasa de errores, independientemente de la metodología utilizada, pudiendo incluirse en la rutina de laboratorio de manera similar a otros parámetros. 4) Sin embargo, no es sensible a los cambios, y esto limita la utilidad del biomarcador, ya que no serviría para monitorizar, por ejemplo, la respuesta a terapias intervencionales.

- Por otro lado, la prueba nos aporta información, en este caso sobre parámetros clínicamente significativos como puede ser el riesgo a desarrollar EH a largo plazo. Como se ha demostrado, esta prueba permite clasificar a los pacientes en función del riesgo independientemente de otros factores tales como la función hepática o la presencia de EH mínima. Sin embargo, en este trabajo no se ha estudiado la asociación con otros parámetros como el tiempo hasta la resolución, recurrencia o incluso la frecuencia de las recurrencias de EH. No obstante, desde aquí planteamos que estudios posteriores podrán evaluar estos parámetros e incrementar la utilidad del biomarcador.

- Finalmente, la prueba debe generar un impacto y tener un beneficio clínico en términos del bienestar (calidad de vida, reingresos) y la supervivencia del paciente, así como del sistema sanitario a nivel de consumo de recursos. Gracias a la identificación de grupos de riesgo, se podrán optimizar los recursos disponibles para atender a los pacientes con mayor riesgo de manera anticipada. Esto se prevé impacte tanto en el bienestar del paciente como en la mortalidad asociada a EH, así como sobre la frecuencia de complicaciones relacionadas con la enfermedad hepática.

Por todo ello, se postula esta prueba como un biomarcador de susceptibilidad o riesgo de gran utilidad en práctica clínica. De acuerdo a los criterios generados por el grupo de trabajo FDA-NIH “BEST” (*Biomarkers, EndpointS and other Tools*), sería útil para guiar las estrategias preventivas o para identificar un grupo de pacientes sobre el que se debería iniciar una vigilancia más intensiva (259). Esto se considera algo necesario en términos tanto de salud como económicos, ya que un artículo

reciente demuestra un incremento de casi el 50% en los costes de hospitalización de pacientes con EH en Estados Unidos desde 2010 a 2014, momento en el que se alcanzaron los 12.000 millones de dólares (260).

En la Tabla 31 se comparan las distintas estrategias para la evaluación del riesgo de EH más extendidas, junto con la huella genética aquí propuesta, usando una serie de criterios como la facilidad de aplicación, la calidad de los datos que la sustentan y el rendimiento de la prueba. Según estos criterios, la huella genética sería superior a otras pruebas en casi todos los aspectos. No obstante, cabe destacar la ausencia de un grupo de pacientes en el estudio, los que presentaban Child-Pugh C; aunque esta ausencia está justificada debido a que estos pacientes tienen una disfunción hepática severa, y posiblemente cirrosis descompensada. Por ello, el rendimiento de la prueba en términos predictivos en este subgrupo tiene menor valor. Por otro lado, la prueba no ha podido ser validada mediante pruebas psicométricas establecidas debido a la ausencia de datos en la cohorte de validación. Sin embargo, los resultados en la cohorte de estimación establecen la independencia de la huella genética respecto de la evaluación de EH mínima por PHES o FCP por lo cual este punto merece una discusión aparte. De cualquier manera, se espera que estos aspectos podrán ser solventados en estudios venideros que analicen estos datos en todos los subgrupos de pacientes.

Respecto de los otros puntos a discutir, la necesidad de equipamiento especial no va más allá de una qPCR y técnicas electroforéticas, disponibles en los servicios de laboratorio de la mayoría de los hospitales.

Además de las ya comentadas, el estudio presenta una limitación que se ha de considerar, ya que las cohortes de estimación y validación

presentan diferencias en distintos parámetros. En este sentido, la mayoría de los trabajos proponen que, para la validación de unos resultados, las cohortes deben ser similares entre sí. No obstante, en muchas ocasiones esto limita la extrapolación de los resultados a otros escenarios distintos de los ensayados. En nuestro caso, teniendo en cuenta que los criterios de inclusión y exclusión son los mismos, la cohorte de validación presentó pacientes con enfermedad más avanzada y con una mayor acentuación de otros parámetros clínicos o bioquímicos. Estas diferencias en las cohortes, lejos de ser una virtud o una ventaja, podrían otorgarle fortaleza al estudio ya que el valor de la huella genética se mantiene en todos los escenarios ensayados.

Por otro lado, este estudio analiza la predisposición al desarrollo de EH en el tiempo de manera estática, retrospectiva, con datos clínicos y bioquímicos basales, ante una enfermedad dinámica cuyo riesgo individual puede variar en el tiempo. A pesar de tener en cuenta el trasplante y la muerte por causa no hepática como eventos competitivos en el análisis, hay otros factores que pueden modificar el curso de la enfermedad que no se han podido tener en cuenta por la dificultad en la recopilación de los datos. Por ejemplo, el uso de cierta medicación, la eliminación de la noxa que produce la cirrosis o el consumo activo de alcohol.

Tabla 31. *Valoración de las estrategias para la evaluación del riesgo de EH.*

Factores		Estrategias para la evaluación del riesgo de EH							
Fácil de usar	<i>Point-of-care</i>								
	Tiempo <10 minutos								
	No personal cualificado								
	No equipamiento especial								
	Validado mediante pruebas psicométricas establecidas								
Calidad de los datos	<i>Cutoffs</i> validados								
	Predice resultados clinicos								
	Todos los subgrupos presentes en el estudio								
Características de la prueba	Aplicable a grandes poblaciones								
	Alto VPP								
	Alto NPV								

Finalmente, y más allá de utilidad clínica que se plantea, la asociación de estas variantes al desarrollo de EH pone de manifiesto que los genes en su área de influencia pueden jugar un papel en la fisiopatología de la enfermedad. En esta línea, numerosos estudios han encontrado asociaciones entre variantes en genes con implicación incierta sobre algún rasgo, que posteriormente se han confirmado mediante análisis funcionales, como el caso recientemente descrito en el gen *HSD17B13* (261). Más todavía, un análisis en profundidad de la funcionalidad del gen, y de los efectos de la variante sobre la estructura o expresión del mismo, nos permitiría, incluso, proponerlo como diana terapéutica para prevenir el desarrollo de la enfermedad. El análisis funcional *in silico* demuestra que a través de diversos mecanismos (epigenéticos, sitios de unión a factores de transcripción o pérdida de función), estas variantes afectan a la regulación de estos genes y, posiblemente, a las rutas biológicas en las que participan. Así, y hasta la fecha, ninguno de los genes que podrían verse afectados por las variantes asociadas con el desarrollo de la enfermedad en este estudio (*SLC1A3*, *SLC1A5*, *FUT2* y *TLR9*), han demostrado implicación alguna sobre la fisiopatología de la EH. Además, estos datos resaltan el papel de procesos como el transporte de glutamato y glutamina, la interacción microbio-hospedador y la inflamación en el desarrollo de EH. Estudios futuros podrán corroborar el papel de estos genes y su influencia individual sobre la fisiopatología de la enfermedad.

6.3 Estudio de asociación de genes candidatos

Los errores en el genotipado (el genotipo observado no se corresponde con el genotipo real) pueden ocurrir debido a cuatro categorías

principales: la secuencia de ADN en sí misma, la cantidad o calidad del ADN en la muestra, artefactos bioquímicos o errores humanos. A fin de garantizar la calidad en la obtención de los datos en este estudio, y para poder comparar las plataformas con el objetivo de optimizar recursos, se ha procurado tener todos ellos en cuenta, de la siguiente manera:

El equilibrio de Hardy-Weinberg establece que las frecuencias de los genotipos permanecen constantes a lo largo de las generaciones bajo las presunciones de población infinita, número discreto de generaciones, apareamiento aleatorio, ausencia de selección, migración e igualdad de frecuencias genotípicas iniciales en ambos sexos. La desviación del equilibrio por parte de una variante en una población estudio puede estar causada por cualquiera de estos factores, pero también puede deberse a un error en el genotipado. Los errores en el genotipado son factores de reconocida influencia sobre los resultados de los estudios de asociación genética, y han sido objeto de larga discusión (239). En ciertas plataformas de análisis la discriminación alélica de los individuos heterocigotos se ve comprometida respecto de los homocigotos, existiendo una pérdida muestral para estos genotipos que puede distorsionar el equilibrio. No obstante, si tuviéramos en cuenta también los casos, incluso dentro de una cohorte global, las desviaciones del equilibrio podrían también ser un reflejo del papel del polimorfismo genotipado en la susceptibilidad a la enfermedad. Es por ello que, a la hora de cribar los polimorfismos, solo hemos tenido en cuenta las frecuencias en la población control. Sin embargo, hasta la fecha no existen unas guías concretas para rechazar los SNPs que se alejan del equilibrio y, en la práctica, solo se recomienda hacer una comprobación exhaustiva de manera individual en aquellos SNPs que están por debajo de un umbral de p-valor predeterminado (en nuestro caso

$\alpha=10^{-3}$). No obstante, la realidad es que la mayoría de estudios de asociación (genoma completo o genes candidatos) en los que se interrogan múltiples variantes terminan por excluir de manera definitiva las variantes que muestran desviación, y obtienen, en la medida de lo posible, la información de ese *locus* a partir de otras variantes en desequilibrio de ligamiento. En nuestro estudio las variantes con ID (Ref SNP ID, NCBI) rs689466, rs2288629 y rs229395 mostraron una clara desviación del equilibrio, con p-valores $\alpha<10^{-3}$, y fueron por lo tanto eliminados. Esta estimación puede realizarse de manera sencilla usando el *software* disponible en la nube para la plataforma de alto rendimiento el cual nos permite además agregar datos de distintas reacciones de PCR y analizarlos de manera conjunta, ahorrando tiempo y facilitando el *clustering* en ensayos con una MAF baja. Gracias al cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg pudimos garantizar la calidad en el proceso de genotipado y evitar el sesgo producido en el *genotype calling*, el cual inflaría el error tipo I en el estudio. Sin embargo, no se pudo identificar si era un efecto dependiente de la plataforma.

Por otro lado, se considera que una de las principales causas que puede llevar a la ineficiencia del *genotype calling* es la presencia de inhibidores de PCR en las muestras. Se ha demostrado que tanto el tejido de origen de ADN, como el método de purificación pueden introducir potenciales inhibidores de la PCR en la muestra (240). Los inhibidores derivados del tejido pueden ser proteínas, heparina o grupos hemo, mientras que el método de purificación puede dejar trazas de fenol, proteasas, detergentes y sales (citrato y EDTA). En ambos casos, lo que suele conllevar es la aparición de *clusters* en cometa, o a la ausencia total de amplificación de las muestras, que formarían *cluster* con los NTCs. Según lo observado en este, y otros estudios, incluso en los escenarios más

exigentes, la presencia de contaminantes en algunas muestras es algo esperable. Dichos contaminantes deben ser buscados de manera activa, y las muestras identificadas y corregidas ya que, caso contrario, la contaminación podría conducir sistemáticamente a una clasificación incorrecta de los genotipos a favor de los heterocigotos (241). En este sentido, y a pesar de que, para la consecución de los demás objetivos, y tal y como se detalla en la metodología, las muestras que no cumplieron con los criterios de calidad fueron extraídas o ensayadas de nuevo, pudimos observar diferencias entre las plataformas en función a la calidad del ADN de partida. Así, las cuatro variantes genotipadas en la plataforma LightCycler consiguieron una tasa de éxito en el genotipado, medida por el *Assay call rate*, superior al 98%, de manera similar a lo que hemos comprobado mediante la experiencia en nuestro laboratorio, y concordante con los datos de referencia del equipo. No obstante, los resultados presentados demuestran una mayor dependencia de la calidad del ADN en la plataforma OpenArray que en la LightCycler. Esto puede ser debido a que volúmenes más pequeños de reacción son más sensibles a la presencia de inhibidores (33nL vs. 20μL) (242).

Por otro lado, en ciertas ocasiones hemos observado datos *off-cluster* que, a pesar de tener fluorescencia similar al resto, aparecen como una anomalía en el gráfico de discriminación alélica y afectan al *genotype calling*. Esto ha podido deberse a dos factores relacionados mayormente con la secuencia de ADN: que el gen tenga una variante en el número de copias en un individuo heterocigoto, o la existencia de un SNP adicional en la región de los cebadores o la sonda. El diseño de los ensayos incluye varias comprobaciones para asegurar que los cebadores y sondas no afectan a otro polimorfismo más que el de interés. Sin embargo, el creciente número de SNPs que se van descubriendo en los estudios que se están llevando a cabo

en poblaciones de distintas etnias, hace posible pensar que el ensayo se haya diseñado sobre un polimorfismo previamente desconocido. No obstante, la baja proporción en la que este *off-cluster* ha ocurrido en nuestro estudio nos permitió eliminar estas muestras sin perder demasiada información y sin afectar de manera significativa al *genotype calling*.

En otro orden de ideas, los errores relacionados con el factor humano pueden llevarnos de igual manera a fallos en el genotipado, y pueden abarcar desde confusiones en el etiquetado, contaminaciones por una incorrecta manipulación o descuidos en el protocolo hasta errores el manejo de los datos, tanto pre- como post- qPCR, tal y como revisaron F. Pompanon *et al.* (243). En este caso, el uso de la plataforma de alto rendimiento nos ha permitido minimizar, sino eliminar por completo, esta fuente de errores, gracias a: 1) la automatización de los procesos, limitando la manipulación de las muestras y permitiendo el cumplimiento de las guías de recomendación; 2) el elevado número de puntos de control críticos y 3) asegurar la trazabilidad de las muestras en todas las fases del proceso.

Además, las estimaciones realizadas demuestran como esta tecnología sería coste-efectiva siempre que el número de muestras o ensayos a realizar sea elevado, ya que el gasto en recursos (económico y tiempo) es mucho menor gracias al uso de volúmenes muy reducidos, y a la posibilidad de analizar numerosas muestras/ensayos de manera simultánea. Siguiendo la estimación realizada anteriormente, siempre que se analicen más de 2 ensayos en un número de muestras de al menos 960, o más de 4 ensayos en 300 muestras (datos no mostrados), el uso de la plataforma de alto rendimiento será coste-efectivo y quedará, por tanto, justificado.

Tal y como se ha discutido, todas las limitaciones metodológicas del estudio han tratado de ser intervenidas, incluyendo las dependientes de la plataforma o del manejo humano. No obstante, existe una limitación mayor inherente al estudio de genes candidatos que no ha podido ser anulada. A pesar de una selección exhaustiva de los genes y polimorfismos a estudiar a fin de optimizar el coste-efectividad del estudio, se produce un sesgo al interrogar solamente una pequeña parte del genoma. Por ello, e independientemente de las asociaciones descritas en este trabajo, no hay que obviar que posiblemente existan otras, más aún en una enfermedad multifactorial y compleja como la que nos trata.

6.4 Conclusiones

- La presencia de genotipos desfavorables en variantes de riesgo podría explicar las diferencias observadas en el desarrollo de eventos de EH en pacientes con cirrosis.

- Este trabajo enfatiza el papel de procesos tales como el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal mediante interacciones microbio-hospedador, la respuesta pro-inflamatoria y el metabolismo y transporte de glutamina en la fisiopatología de la EH, resaltando nuevos genes como posibles dianas.

- Esta huella genética nos permite predecir el desarrollo de EH, clasificando a los pacientes en grupos de bajo, medio y alto riesgo. Esta herramienta podría implementarse en la práctica clínica, como parte del proceso de toma de decisiones en el manejo de los pacientes cirróticos.

- De manera paralela, se determina que la plataforma de genotipado de alto rendimiento es coste-efectiva a partir de un número de ensayos o muestras moderado presentando, además, numerosas ventajas respecto de otras plataformas que facilitan la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

7 REFERENCIAS

1. Goodman ZD. Liver Biopsy Diagnosis of Cirrhosis. In: Berzigotti A, Bosch J, editors. Diagnostic Methods for Cirrhosis and Portal Hypertension. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 17-31.
2. Laennec RTH. Traité de l'auscultation médiate, et des maladies des poumons et du coeur: Société Typographique Belge; 1837.
3. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. The Lancet. 2008;371(9615):838-51.
4. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. The Lancet. 2014;383(9930):1749-61.
5. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Best practice & research Clinical gastroenterology. 2011;25(2):195-206.
6. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2017;14:397.
7. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger y Fordtran. Enfermedades digestivas y hepáticas + ExpertConsult: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento: Elsevier Health Sciences; 2017.
8. Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. J Hepatol. 2009;50(3):604-20.
9. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. J Hepatol. 2006;44(1):217-31.

10. GBD-2013-Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England). 2015;385(9963):117-71.
11. Hytioglou P, Snover DC, Alves V, Balabaud C, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Beyond "cirrhosis": a proposal from the International Liver Pathology Study Group. *American journal of clinical pathology*. 2012;137(1):5-9.
12. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* (London, England). 2013;381(9865):468-75.
13. Saffioti F, Pinzani M. Development and Regression of Cirrhosis. *Digestive Diseases*. 2016;34(4):374-81.
14. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529-38.
15. Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver International*. 2018;38:2-6.
16. Ge PS, Campion EW, Runyon BA. Treatment of Patients with Cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(8):767-77.

17. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013;58(3):593-608.
18. Scaglione S, Kliethermes S, Cao G, Shoham D, Durazo R, Luke A, et al. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. *J Clin Gastroenterol*. 2015;49(8):690-6.
19. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *American family physician*. 2006;74(5):756-62.
20. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. Major problems in clinical surgery. 1964;1:1-85.
21. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001;33(2):464-70.
22. Gines P, Quintero E, Arroyo V, Teres J, Bruguera M, Rimola A, et al. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology*. 1987;7(1):122-8.
23. Angeli P, Bernardi M, Villanueva C, Francoz C, Mookerjee RP, Trebicka J, et al. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2018;69(2):406-60.

24. de Franchis R. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol.* 2015;63(3):743-52.
25. Garcia-Tsao G. Natural History of Cirrhosis. In: Keaveny AP, Cárdenas A, editors. *Complications of Cirrhosis: Evaluation and Management.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 13-20.
26. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology.* 2010;51(4):1445-9.
27. Garcia-Tsao G. Cirrhosis and Portal Hypertension: Staging and Prognosis. In: Berzigotti A, Bosch J, editors. *Diagnostic Methods for Cirrhosis and Portal Hypertension.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 1-13.
28. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients With Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology.* 2013;144(7):1426-37.e9.
29. Hernaez R, Solà E, Moreau R, Ginès P. Acute-on-chronic liver failure: an update. *Gut.* 2017;66(3):541.
30. Arroyo V, Jalan R. Acute-on-Chronic Liver Failure: Definition, Diagnosis, and Clinical Characteristics. *Semin Liver Dis.* 2016;36(02):109-16.

31. Jalan R, Saliba F, Pavesi M, Amoros A, Moreau R, Gines P, et al. Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol*. 2014;61(5):1038-47.
32. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S121-31.
33. Claria J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, et al. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology*. 2016;64(4):1249-64.
34. Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *Journal of Hepatology*. 2015;63(5):1272-84.
35. Villanueva C, Balanzo J. Variceal bleeding : pharmacological treatment and prophylactic strategies. *Drugs*. 2008;68(16):2303-24.
36. Bruno S, Saibeni S, Bagnardi V, Vandelli C, De Luca M, Felder M, et al. Mortality risk according to different clinical characteristics of first episode of liver decompensation in cirrhotic patients: a nationwide, prospective, 3-year follow-up study in Italy. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(7):1112-22.
37. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, et al. Beta-Blockers to Prevent Gastroesophageal Varices in Patients with Cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(21):2254-61.

38. Wedd JP, Kalra A, Biggins SW. Predictors of Clinical Complications of Cirrhosis. In: Keaveny AP, Cárdenas A, editors. *Complications of Cirrhosis: Evaluation and Management*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 29-37.
39. Tsochatzis EA, Gerbes AL. Diagnosis and treatment of ascites. *Journal of Hepatology*. 2017;67(1):184-5.
40. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol*. 2014;60(6):1310-24.
41. Salerno F, Gerbes A, Gines P, Wong F, Arroyo V. Diagnosis, prevention and treatment of hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Gut*. 2007;56(9):1310-8.
42. Solà E, Ginès P. Hepatorenal Syndrome. In: Keaveny AP, Cárdenas A, editors. *Complications of Cirrhosis: Evaluation and Management*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 141-8.
43. Ellul MA, Gholkar SA, Cross TJ. Hepatic encephalopathy due to liver cirrhosis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2015;351(5):h4187-h.
44. Amodio P. Hepatic Encephalopathy: Historical Remarks. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2015;5(Suppl 1):S4-S6.
45. Reuben A. There is nothin' like a Dame. *Hepatology*. 2002;35(4):983-5.
46. Summerskill WHJ. Aguecheek's disease. *Gut*. 1978;19(6):468-9.

47. Stepanova M, Mishra A, Venkatesan C, Younossi ZM. In-hospital mortality and economic burden associated with hepatic encephalopathy in the United States from 2005 to 2009. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2012;10(9):1034-41.e1.
48. Rakoski MO, McCammon RJ, Piette JD, Iwashyna TJ, Marrero JA, Lok AS, et al. Burden of cirrhosis on older Americans and their families: analysis of the health and retirement study. *Hepatology*. 2012;55(1):184-91.
49. Shaheen AA, Nguyen HH, Congly SE, Kaplan GG, Swain MG. Nationwide Estimates and Risk Factors of Hospital Readmission in Patients with Cirrhosis in the United States. *Liver Int*. 2019.
50. Bajaj JS, Schubert CM, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Topaz A, et al. Persistence of Cognitive Impairment After Resolution of Overt Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*. 2010;138(7):2332-40.
51. Umapathy S, Dhiman RK, Grover S, Duseja A, Chawla YK. Persistence of Cognitive Impairment After Resolution of Overt Hepatic Encephalopathy. *The American Journal Of Gastroenterology*. 2014;109:1011.
52. Mullen KD, Prakash RK. Introduction, Nomenclature, and Classification of Hepatic Encephalopathy. In: Mullen KD, Prakash RK, editors. *Hepatic Encephalopathy*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 1-4.
53. Montagnese S, De Pitta C, De Rui M, Corrias M, Turco M, Merkel C, et al. Sleep-wake abnormalities in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2014;59(2):705-12.

54. Cordoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT. High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology*. 1998;27(2):339-45.
55. Nardone R, Taylor AC, Höller Y, Brigo F, Lochner P, Trinkka E. Minimal hepatic encephalopathy: A review. *Neuroscience Research*. 2016.
56. Patidar KR, Thacker LR, Wade JB, Sterling RK, Sanyal AJ, Siddiqui MS, et al. Covert hepatic encephalopathy is independently associated with poor survival and increased risk of hospitalization. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(11):1757-63.
57. Bajaj JS, Saeian K, Schubert CM, Hafeezullah M, Franco J, Varma RR, et al. Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology*. 2009;50(4):1175-83.
58. Roman E, Cordoba J, Torrens M, Torras X, Villanueva C, Vargas V, et al. Minimal hepatic encephalopathy is associated with falls. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(3):476-82.
59. Romero-Gómez M, Grande L, Camacho I, Benitez S, Irlés JA, Castro M. Altered response to oral glutamine challenge as prognostic factor for overt episodes in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*. 2002;37(6):781-7.
60. Ampuero J, Montoliu C, Simon-Talero M, Aguilera V, Millan R, Marquez C, et al. Minimal hepatic encephalopathy identifies patients at risk of faster cirrhosis progression. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(3):718-25.

61. Romero-Gomez M, Boza F, Garcia-Valdecasas MS, Garcia E, Aguilar-Reina J. Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(9):2718-23.
62. Wijdicks EFM. Hepatic Encephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(17):1660-70.
63. Kappus MR, Bajaj JS. Covert hepatic encephalopathy: not as minimal as you might think. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(11):1208-19.
64. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2002;35(3):716-21.
65. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study Of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*. 2014;60(2):715-35.
66. Conn HO, Leevy CM, Vlahcevic ZR, Rodgers JB, Maddrey WC, Seeff L, et al. Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double blind controlled trial. *Gastroenterology*. 1977;72(4 Pt 1):573-83.

67. Ortiz M, Cordoba J, Doval E, Jacas C, Pujadas F, Esteban R, et al. Development of a clinical hepatic encephalopathy staging scale. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(6):859-67.
68. Bajaj JS, Cordoba J, Mullen KD, Amodio P, Shawcross DL, Butterworth RF, et al. Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy--an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(7):739-47.
69. Thomsen KL, Macnaughtan J, Tritto G, Mookerjee RP, Jalan R. Clinical and Pathophysiological Characteristics of Cirrhotic Patients with Grade 1 and Minimal Hepatic Encephalopathy. *PLOS ONE.* 2016;11(1):e0146076.
70. Shawcross DL, Dunk AA, Jalan R, Kircheis G, de Knecht RJ, Laleman W, et al. How to diagnose and manage hepatic encephalopathy: a consensus statement on roles and responsibilities beyond the liver specialist. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 2016;28(2):146-52.
71. Montagnese S, Amodio P, Morgan MY. Methods for diagnosing hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a multidimensional approach. *Metab Brain Dis.* 2004;19(3-4):281-312.
72. Amodio P. Hepatic encephalopathy: Diagnosis and management. *Liver International.* 2018(February):1-10.
73. Bajaj JS, Wade JB, Sanyal AJ. Spectrum of neurocognitive impairment in cirrhosis: Implications for the assessment of hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 2009;50(6):2014-21.

74. Liu R, Ahluwalia V, Kang JD, Ghosh SS, Zhou H, Li Y, et al. Effect of Increasing Age on Brain Dysfunction in Cirrhosis. *Hepatology Communications*. 2018;3(1):63-73.
75. Nabi E, Bajaj JS. Useful Tests for Hepatic Encephalopathy in Clinical Practice. *Current gastroenterology reports*. 2014;16(1):362.
76. Ridola L, Nardelli S, Gioia S, Riggio O. Quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(48):5446-53.
77. Romero Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo J, Fernandez A, Flavia M, et al. [Normality tables in the Spanish population for psychometric tests used in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy]. *Medicina clinica*. 2006;127(7):246-9.
78. Gimenez-Garzo C, Garces JJ, Urios A, Mangas-Losada A, Garcia-Garcia R, Gonzalez-Lopez O, et al. The PHES battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171211.
79. Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2002;35(2):357-66.
80. Ampuero J, Simón M, Montoliú C, Jover R, Serra MÁ, Córdoba J, et al. Minimal Hepatic Encephalopathy and Critical Flicker Frequency Are Associated With Survival of Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1483-9.

81. Elsass P, Christensen SE, Ranek L, Theilgaard A, Tygstrup N. Continuous reaction time in patients with hepatic encephalopathy. A quantitative measure of changes in consciousness. *Scand J Gastroenterol*. 1981;16(3):441-7.
82. Amodio P, Pellegrini A, Ubiali E, Mathy I, Piccolo FD, Orsato R, et al. The EEG assessment of low-grade hepatic encephalopathy: Comparison of an artificial neural network-expert system (ANNES) based evaluation with visual EEG readings and EEG spectral analysis. *Clinical Neurophysiology*. 2006;117(10):2243-51.
83. Romero-Gómez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, de Terán LC, Corpas R, Camacho I, et al. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*. 2004;41(1):49-54.
84. Ampuero J, Gómez AG, Del Mar Vilorio M, Camacho I, Moro A, Romero-Gomez M. Oral glutamine challenge predicts risk and defines hepatic encephalopathy types. *Journal of Hepatology*. 2017;66(1):S378-S9.
85. Montoliu C, Cauli O, Urios A, ElMlili N, Serra MA, Giner-Duran R, et al. 3-nitro-tyrosine as a peripheral biomarker of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(9):1629-37.
86. Tapper EB, Parikh ND, Waljee AK, Volk M, Carlozzi NE, Lok ASF. Diagnosis of Minimal Hepatic Encephalopathy: A Systematic Review of Point-of-Care Diagnostic Tests. *The American Journal Of Gastroenterology*. 2018;113:529.

87. Bajaj JS, Saeian K, Verber MD, Hirschke D, Hoffmann RG, Franco J, et al. Inhibitory Control Test Is a Simple Method to Diagnose Minimal Hepatic Encephalopathy and Predict Development of Overt Hepatic Encephalopathy. 2007;102(4):754-60.
88. Allampati S, Duarte-Rojo A, Thacker LR, Patidar KR, White MB, Klair JS, et al. Diagnosis of minimal hepatic encephalopathy using Stroop EncephalApp: a multicenter US-based, norm-based study. 2016;111(1):78.
89. Lauridsen MM, Vilstrup H, Schaffalitzky de Muckadell OB, Heuman DM, Bajaj JS. Quality of Life Assessment can be Used to Diagnose Covert Hepatic Encephalopathy. *Journal of Hepatology*. 2016;64(2):S276-S7.
90. Nabi E, Thacker LR, Wade JB, Sterling RK, Stravitz RT, Fuchs M, et al. Diagnosis of covert hepatic encephalopathy without specialized tests. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(8):1384-9.e2.
91. Campagna F, Montagnese S, Ridola L, Senzolo M, Schiff S, De Rui M, et al. The animal naming test: An easy tool for the assessment of hepatic encephalopathy. 2017;66(1):198-208.
92. Mukthinuthalapati VVPK, Akinyeye S, Fricker ZP, Syed M, Orman ES, Nephew L, et al. Early predictors of outcomes of hospitalization for cirrhosis and assessment of the impact of race and ethnicity at safety-net hospitals. *PLOS ONE*. 2019;14(3):e0211811.
93. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sørensen HT, Vilstrup H. Clinical course of alcoholic liver cirrhosis: a Danish population-based cohort study. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(5):1675-82.

94. Bajaj JS. Hepatic encephalopathy: classification and treatment. *Journal of Hepatology*. 2018;68(4):838-9.
95. Dharel N, Bajaj JS. Definition and Nomenclature of Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2015;5(S1):S37-S41.
96. Bale A, Pai CG, Shetty S, Balaraju G, Shetty A. Prevalence of and Factors Associated With Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients With Cirrhosis of Liver. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2018;8(2):156-61.
97. Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, et al. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 1999;30(5):890-5.
98. Benvegnu L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut*. 2004;53(5):744-9.
99. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, et al. Rifaximin Treatment in Hepatic Encephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(12):1071-81.
100. Shawcross DL. Is it time to target gut dysbiosis and immune dysfunction in the therapy of hepatic encephalopathy? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2015;9(5):539-42.

101. Romero-Gómez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *Journal of hepatology*. 2015;62(2):437-47.
102. Bosoi CR, Rose CF. Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2013;28(2):175-8.
103. Rama Rao KV, Norenberg MD. BRAIN ENERGY METABOLISM AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN ACUTE AND CHRONIC HEPATIC ENCEPHALOPATHY. *Neurochemistry international*. 2012;60(7):697-706.
104. Bosoi CR, Rose CF. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metabolic brain disease*. 2009;24(1):95-102.
105. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: The concept of synergism. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2008;38 Suppl 1:S116-21.
106. Rahimi RS, Rockey DC. Novel Ammonia-Lowering Agents for Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis*. 2015;19(3):539-49.
107. Shalimar, Sheikh MF, Mookerjee RP, Agarwal B, Acharya SK, Jalan R. Prognostic Role of Ammonia in Patients With Cirrhosis.0(0).
108. Jayakumar AR, Rama Rao KV, Norenberg MD. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: Mechanistic aspects. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2015;5(S1):S21-S8.

109. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International*. 2009;29(6):783-8.
110. Romero-Gómez M, Jover M, Galán JJ, Ruiz A. Gut ammonia production and its modulation. *Metabolic brain disease*. 2009;24(1):147-57.
111. Wright G, Noiret L, Olde Damink SWM, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31(2):163-75.
112. Ito S, Yanai M, Yamaguchi S, Couraud P-O, Ohtsuki S. Regulation of Tight-Junction Integrity by Insulin in an In Vitro Model of Human Blood–Brain Barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017.
113. Ott P, Vilstrup H. Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses. *Metabolic brain disease*. 2014;29(4):901-11.
114. Sørensen M. Update on cerebral uptake of blood ammonia. *Metabolic brain disease*. 2013;28(2):155-9.
115. Rama Rao KV, Norenberg MD. Glutamine in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: the trojan horse hypothesis revisited. *Neurochemical research*. 2014;39(3):593-8.
116. Bjerring PN, Hauerberg J, Frederiksen H-J, Jorgensen L, Hansen BA, Tofteng F, et al. Cerebral glutamine concentration and lactate-pyruvate ratio in patients with acute liver failure. *Neurocritical care*. 2008;9(1):3-7.

117. Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* (Baltimore, Md). 1999;30(4):876-80.
118. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2006;44(4):788-94.
119. Skowrońska M, Albrecht J. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Neurochemistry international*. 2013;62(5):731-7.
120. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;16(5):249-63.
121. Zwingmann C, Desjardins P, Hazell A, Chatauret N, Michalak A, Butterworth RF. Reduced expression of astrocytic glycine transporter (Glyt-1) in acute liver failure. *Metabolic brain disease*. 2002;17(4):263-73.
122. Rangroo Thrane V, Thrane AS, Wang F, Cotrina ML, Smith NA, Chen M, et al. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nature medicine*. 2013;19(12):1643-8.
123. Bodega G, Suárez I, López-Fernández LA, García MI, Köber M, Penedo M, et al. Ammonia induces aquaporin-4 rearrangement in the plasma membrane of cultured astrocytes. *Neurochemistry international*. 2012;61(8):1314-24.
124. Lachmann V, Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Häussinger D. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an

oxidative stress dependent manner. Archives of biochemistry and biophysics. 2013;536(2):143-51.

125. Chen J-R, Wang B-N, Tseng G-F, Wang Y-J, Huang Y-S, Wang T-J. Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. BMC neuroscience. 2014;15:15-.

126. McConnell JR, Antonson DL, Ong CS, Chu WK, Fox IJ, Heffron TG, et al. Proton spectroscopy of brain glutamine in acute liver failure. Hepatology (Baltimore, Md). 1995;22(1):69-74.

127. Rajendram R, Preedy VR, Patel VB. Glutamine in clinical nutrition. Glutamine in Clinical Nutrition. 2015:1-551.

128. Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. Seminars in cell & developmental biology. 2012;23(4):362-9.

129. Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. Clin Sci (Lond). 2005;108(3):185-94.

130. Ducroc R, Sakar Y, Fanjul C, Barber A, Bado A, Lostao MP. Luminal leptin inhibits L-glutamine transport in rat small intestine: involvement of ASCT2 and B0AT1. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2010;299(1):G179-85.

131. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function

relationships and relevance to human health. *Frontiers in chemistry*. 2014;2(August):61-.

132. Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochemical pharmacology*. 2010;80(9):1303-8.

133. Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. Induction of the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes by glutamine. *Neurochemistry international*. 2003;43(4-5):517-23.

134. James LA, Lunn PG, Middleton S, Elia M. Glutamine oxidation and utilization by rat and human oesophagus and duodenum. *The British journal of nutrition*. 1999;81(4):323-9.

135. Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *The American journal of medicine*. 2003;114(3):188-93.

136. Aldridge DR, Tranah EJ, Shawcross DL. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: Role of ammonia and systemic inflammation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2015;5(S1):S7-S20.

137. Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, et al. Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*. 2010;139(2):675-84.

138. Butterworth RF. The liver-brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(9):522-8.
139. Marini JC, Broussard SR. Hyperammonemia increases sensitivity to LPS. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006;88(2):131-7.
140. Romero-Gómez M. Role of Phosphate-Activated Glutaminase in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2005;20(4):319-25.
141. Romero-Gómez M. Pharmacotherapy of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2010;11(8):1317-27.
142. Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 1996;44(8):474-82.
143. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(6):1257-66.
144. Bode C, Kugler V, Bode JC. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *Journal of hepatology*. 1987;4(1):8-14.

145. Bajaj JS, O'Leary JG, Reddy KR, Wong F, Biggins SW, Patton H, et al. Survival in infection-related acute-on-chronic liver failure is defined by extrahepatic organ failures. *Hepatology*. 2014;60(1):250-6.
146. Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The Systemic Inflammatory Response Syndrome in Acute Liver Failure. *Hepatology*. 2000;32(4):734-9.
147. Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2004;24(2):110-6.
148. Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, et al. IL-6 and IL-18 in Blood May Discriminate Cirrhotic Patients With and Without Minimal Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2009;43(3):272-9.
149. Shawcross DL, Wright G, Olde Damink SWM, Jalan R. Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 2007;22(1):125-38.
150. Luo M, Guo J-Y, Cao W-K. Inflammation: A novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(41):11815-.
151. Saper CB. The Dance of the Perivascular and Endothelial Cells: Mechanisms of Brain Response to Immune Signaling. *Neuron*. 2010;65(1):4-6.

152. Hinkerohe D, Smikalla D, Haghikia A, Heupel K, Haase CG, Dermietzel R, et al. Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia*. 2005;52(2):85-97.
153. McMillin M, Frampton G, Thompson M, Galindo C, Standeford H, Whittington E, et al. Neuronal CCL2 is upregulated during hepatic encephalopathy and contributes to microglia activation and neurological decline. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11(1):121.
154. Tilg H, Cani PD, Mayer EA. Gut microbiome and liver diseases. *Gut*. 2016;65(12):2035-44.
155. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014;63(9):1513-21.
156. Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, Karin M, Loomba R, Schnabl B, et al. The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2018;15(7):397-411.
157. Richardson PD, Withrington PG. Liver blood flow. I. Intrinsic and nervous control of liver blood flow. *Gastroenterology*. 1981;81(1):159-73.
158. Zoller H, Tilg H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Metabolism*. 2016;65(8):1151-60.
159. Hur KY, Lee M-S. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes & metabolism journal*. 2015;39(3):198-203.

160. Wiest R, Albillos A, Trauner M, Bajaj JS, Jalan R. Targeting the gut-liver axis in liver disease. *Journal of Hepatology*. 2017;67(5):1084-103.
161. Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*. 2016;99:110-32.
162. Filiano AJ, Gadani SP, Kipnis J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Research*. 2015;1617:18-27.
163. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. 2016;167(5):1339-53.e21.
164. Mancini A, Campagna F, Amodio P, Tuohy KM. Gut : liver : brain axis: the microbial challenge in the hepatic encephalopathy. *Food & function*. 2018;9(3):1373-88.
165. Maslennikov R, Pavlov C, Ivashkin V. Small intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis: systematic review and meta-analysis. *Hepatol Int*. 2018.
166. Garcovich M, Zocco MA, Roccarina D, Ponziani FR, Gasbarrini A. Prevention and treatment of hepatic encephalopathy: focusing on gut microbiota. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(46):6693-700.
167. Kang DJ, Betrapally NS, Ghosh SA, Sartor RB, Hylemon PB, Gillevet PM, et al. Gut microbiota drive the development of

neuroinflammatory response in cirrhosis in mice. *Hepatology*. 2016;64(4):1232-48.

168. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2014;60(1):197-209.

169. Patel VC, Leong LEX, Koller G, Knapp S, Lai G, Singanayagam A, et al. Altered Gut Microbial Profile is a Proponent of Bacterial Translocation in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Journal of Hepatology*. 2016;64(2):S453-S4.

170. Shi H, Jiang H, Li L. Intestinal Bacterial Translocation in Rats with Cirrhosis is Related to Intestinal Immune Dysfunction. *Journal of Hepatology*. 2016;64(2):S445-S6.

171. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *Journal of Hepatology*. 2014;60(5):940-7.

172. Zhang Z, Zhai H, Geng J, Yu R, Ren H, Fan H, et al. Large-Scale Survey of Gut Microbiota Associated With MHE Via 16S rRNA-Based Pyrosequencing. *The American Journal of Gastroenterology*. 2013;108(10):1601-11.

173. Bajaj JS, Ridlon JM, Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, et al. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012;302(1):G168-G75.

174. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver International*. 2013;33(1):31-9.
175. Betrapally NS, Gillevet PM, Bajaj JS. Gut microbiome and liver disease. *Translational Research*. 2017;179:49-59.
176. Chastre A, Bélanger M, Nguyen BN, Butterworth RF. Lipopolysaccharide precipitates hepatic encephalopathy and increases blood-brain barrier permeability in mice with acute liver failure. *Liver International*. 2014;34(3):353-61.
177. DeMorrow S. Bile Acids in Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2018.
178. Horvatits T, Drolz A, Roedl K, Rutter K, Ferlitsch A, Fauler G, et al. Serum bile acids as marker for acute decompensation and acute-on-chronic liver failure in patients with non-cholestatic cirrhosis. *Liver Int*. 2017;37(2):224-31.
179. Huang LT, Hsieh CS, Chou MH, Chuang JH, Liou CW, Tiao MM, et al. Obstructive jaundice in rats: cause of spatial memory deficits with recovery after biliary decompression. *World journal of surgery*. 2004;28(3):283-7.
180. Weiss N, Barbier Saint Hilaire P, Colsch B, Isnard F, Attala S, Schaefer A, et al. Cerebrospinal fluid metabolomics highlights dysregulation of energy metabolism in overt hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2016;65(6):1120-30.

181. Huang F, Wang T, Lan Y, Yang L, Pan W, Zhu Y, et al. Deletion of mouse FXR gene disturbs multiple neurotransmitter systems and alters neurobehavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2015;9:70.
182. Campollo O, Sprengers D, Dam G, Vilstrup H, McIntyre N. Protein tolerance to standard and high protein meals in patients with liver cirrhosis. *World J Hepatol*. 2017;9(14):667-76.
183. Merli MB, A; Zelber-Sagi, S; Dasarathy, S; Montagnese, S; Genton, L; Plauth, M; Parés, A. EASL Clinical Practice Guidelines on nutrition in chronic liver disease. *J Hepatol*. 2018.
184. Moratalla A, Ampuero J, Bellot P, Gallego-Duran R, Zapater P, Roger M, et al. Lactulose reduces bacterial DNA translocation, which worsens neurocognitive shape in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Liver Int*. 2017;37(2):212-23.
185. Gluud LL, Vilstrup H, Morgan MY. Nonabsorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2016;64(3):908-22.
186. Rahimi RS, Singal AG, Cuthbert JA, Rockey DC. Lactulose vs polyethylene glycol 3350--electrolyte solution for treatment of overt hepatic encephalopathy: the HELP randomized clinical trial. *JAMA internal medicine*. 2014;174(11):1727-33.
187. Shehata HH, Elfert AA, Abdin AA, Soliman SM, Elkhoully RA, Hawash NI, et al. Randomized controlled trial of polyethylene glycol versus lactulose for the treatment of overt hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018.

188. Mullen KD, Sanyal AJ, Bass NM, Poordad FF, Sheikh MY, Frederick RT, et al. Rifaximin Is Safe and Well Tolerated for Long-term Maintenance of Remission From Overt Hepatic Encephalopathy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014;12(8):1390-7.e2.
189. Kaji K, Takaya H, Saikawa S, Furukawa M, Sato S, Kawaratani H. Rifaximin ameliorates hepatic encephalopathy and endotoxemia without affecting the gut microbiome diversity. 2017;23(47):8355-66.
190. Bai M, Yang Z, Qi X, Fan D, Han G. l-ornithine-l-aspartate for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(5):783-92.
191. Kircheis G. Current state of knowledge of hepatic encephalopathy (Part V): clinical efficacy of L-ornithine-L-aspartate in the management of HE. *Metabolic Brain Disease*. 2016:1-3.
192. Sidhu SS, Sharma BC, Goyal O, Kishore H, Kaur N. L-ornithine L-aspartate in bouts of overt hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2017.
193. Jalan R, Wright G, Davies NA, Hodges SJ. L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Medical hypotheses*. 2007;69(5):1064-9.
194. Di Pascoli M, Fasolato S, Piano S, Bolognesi M, Angeli P. Long-term administration of human albumin improves survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Liver Int*. 2018.
195. Sola E, Sole C, Simon-Talero M, Martin-Llahi M, Castellote J, Garcia-Martinez R, et al. MIDODRINE &ALBUMIN for Preventing

COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH CIRRHOSIS AWAITING Liver transplantation. *J Hepatol.* 2018.

196. Caraceni P, Riggio O, Angeli P, Alessandria C, Neri S, Foschi FG, et al. Long-term albumin administration in decompensated cirrhosis (ANSWER): an open-label randomised trial. *The Lancet.* 2018;391(10138):2417-29.

197. Banares R, Nevens F, Larsen FS, Jalan R, Albillos A, Dollinger M, et al. Extracorporeal albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system in acute-on-chronic liver failure: the RELIEF trial. *Hepatology.* 2013;57(3):1153-62.

198. Dalal R, McGee RG, Riordan SM, Webster AC. Probiotics for people with hepatic encephalopathy. In: McGee RG, editor. 2. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. CD008716-CD.

199. Bajaj JS, Salzman NH, Acharya C, Sterling RK, White MB, Gavis EA, et al. Fecal Microbial Transplant Capsules are Safe in Hepatic Encephalopathy: A Phase 1, Randomized, Placebo-Controlled Trial.0(ja).

200. Bañales JM, Medina JF. Polimorfismos genéticos en la progresión de la enfermedad hepática. *Gastroenterología y Hepatología Continuada.* 2003;2(6):261-5.

201. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, Haas ME, Roselli C, Choi SH, et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nature Genetics.* 2018;50(9):1219-24.

202. Rodriguez-Revena L, Mila M, Rosenberg C, Lamb A, Lee C. Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. *Genetics In Medicine*. 2007;9:600.
203. Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet*. 2007;39(7 Suppl):S7-15.
204. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5:435.
205. Vieira ML, Santini L, Diniz AL, Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and molecular biology*. 2016;39(3):312-28.
206. Legendre M, Pochet N, Pak T, Verstrepen KJ. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome research*. 2007;17(12):1787-96.
207. Karlsen TH, Lammert F, Thompson RJ. Genetics of liver disease: From pathophysiology to clinical practice. *Journal of Hepatology*. 2015;62(1, Supplement):S6-S14.
208. Krawczyk M, Mullenbach R, Weber SN, Zimmer V, Lammert F. Genome-wide association studies and genetic risk assessment of liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(12):669-81.
209. John M, Metwally M, Mangia A, Romero-Gomez M, Berg T, Sheridan D, et al. TLL1 rs17047200 Increases the Risk of Fibrosis

Progression in Caucasian Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2017;153(5):1448-9.

210. Thabet K, Asimakopoulos A, Shojaei M, Romero-Gomez M, Mangia A, Irving WL, et al. MBOAT7 rs641738 increases risk of liver inflammation and transition to fibrosis in chronic hepatitis C. *Nat Commun*. 2016;7:12757.

211. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461(7262):399-401.

212. Eslam M, McLeod D, Kelaeng KS, Mangia A, Berg T, Thabet K, et al. IFN-lambda3, not IFN-lambda4, likely mediates IFNL3-IFNL4 haplotype-dependent hepatic inflammation and fibrosis. *Nat Genet*. 2017;49(5):795-800.

213. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40(12):1461-5.

214. Liu YL, Patman GL, Leathart JB, Piguet AC, Burt AD, Dufour JF, et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2014;61(1):75-81.

215. Appenrodt B, Grunhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51(4):1327-33.

216. Casper M, Mengel M, Fuhrmann C, Herrmann E, Appenrodt B, Schiedermaier P, et al. The INCA trial (Impact of NOD2 genotype-guided antibiotic prevention on survival in patients with liver Cirrhosis and Ascites): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2015;16:83.
217. Bruns T, Peter J, Reuken PA, Grabe DH, Schuldes SR, Brenmoehl J, et al. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. *Liver International*. 2011;32(2):223-30.
218. Plomin R, Haworth CM, Davis OS. Common disorders are quantitative traits. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(12):872-8.
219. Greenberg DA. Linkage analysis of "necessary" disease loci versus "susceptibility" loci. *American journal of human genetics*. 1993;52(1):135-43.
220. Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996;38(5):738-41.
221. Greenberg DA, Abreu P, Hodge SE. The power to detect linkage in complex disease by means of simple LOD-score analyses. *American journal of human genetics*. 1998;63(3):870-9.
222. Rodriguez-Murillo L, Greenberg DA. Genetic association analysis: a primer on how it works, its strengths and its weaknesses. *International Journal of Andrology*. 2008;31(6):546-56.

223. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461:747.
224. Guarner-Argente C, SÁNchez E, Vidal S, RomÁN E, Concepción M, Poca M, et al. Toll-like receptor 4 D299G polymorphism and the incidence of infections in cirrhotic patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2010;31(11):1192-9.
225. Alvarado-Tapias E, Guarner-Argente C, Oblitas E, Sánchez E, Vidal S, Román E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and bacterial infections in patients with cirrhosis and ascites. *World journal of hepatology*. 2018;10(1):124-33.
226. Nieto JC, Sánchez E, Román E, Vidal S, Oliva L, Guarner-Argente C, et al. Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(46):17516-24.
227. Bernal W, Donaldson P, Underhill J, Wendon J, Williams R. Tumor necrosis factor genomic polymorphism and outcome of acetaminophen (paracetamol)-induced acute liver failure. *J Hepatol*. 1998;29(1):53-9.
228. Romero-Gómez M, Jover M, Del Campo JA, Royo JL, Hoyas E, Galán JJ, et al. Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2010;153(5):281-8.
229. Royo JL, Real LM. Genetic Association Studies in Host–Pathogen Interaction Analysis. *Host-Pathogen Interactions: Springer*; 2018. p. 1-11.

230. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Ruckert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2001;34(5):768-73.
231. Yates B, Braschi B, Gray KA, Seal RL, Tweedie S, Bruford EA. Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2017. *Nucleic acids research.* 2017;45(D1):D619-D25.
232. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human mutation.* 2016;37(6):564-9.
233. Dalgleish R, Flicek P, Cunningham F, Astashyn A, Tully RE, Proctor G, et al. Locus Reference Genomic sequences: an improved basis for describing human DNA variants. *Genome Medicine.* 2010;2(4):24-.
234. Yue P, Melamud E, Moulton J. SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC bioinformatics.* 2006;7:166.
235. Yu C-H, Pal LR, Moulton J. Consensus Genome-Wide Expression Quantitative Trait Loci and Their Relationship with Human Complex Trait Disease. *Omics : a journal of integrative biology.* 2016;20(7):400-14.
236. Liu C, Zhang F, Li T, Lu M, Wang L, Yue W, et al. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics.* 2012;13(1):661-.
237. Gil GA, Gomez-Sotelo AI, Ranchal I, Rojas A, Garcia-Valdecasas M, Munoz-Hernandez R, et al. Metformin modifies glutamine metabolism

in an in vitro and in vivo model of hepatic encephalopathy. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*. 2018;110(7):427-33.

238. Carvalho A, Cunha C, Almeida AJ, Osorio NS, Saraiva M, Teixeira-Coelho M, et al. The rs5743836 polymorphism in TLR9 confers a population-based increased risk of non-Hodgkin lymphoma. *Genes and immunity*. 2012;13(2):197-201.

239. Mitchell AA, Cutler DJ, Chakravarti A. Undetected genotyping errors cause apparent overtransmission of common alleles in the transmission/disequilibrium test. *American journal of human genetics*. 2003;72(3):598-610.

240. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. 2012;113(5):1014-26.

241. Flickinger M, Jun G, Abecasis GR, Boehnke M, Kang HM. Correcting for Sample Contamination in Genotype Calling of DNA Sequence Data. *American journal of human genetics*. 2015;97(2):284-90.

242. Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. 2008;1(1):70.

243. Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6:847.

244. Mandorfer M, Scheiner B, Stättermayer AF, Schwabl P, Paternostro R, Bauer D, et al. Impact of patatin-like phospholipase domain containing

3 rs738409 G/G genotype on hepatic decompensation and mortality in patients with portal hypertension. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2018;48(4):451-9.

245. Mayer LB, Krawczyk M, Grünhage F, Lammert F, Stokes CS. A genetic variant in the promoter of phosphate-activated glutaminase is associated with hepatic encephalopathy. *Journal of internal medicine*. 2015;278(3):313-22.

246. Ahn JM, Kim CH, Um SH, Kim KM, Kim TH, Yim SY, et al. Validation study associating glutaminase promoter variations with hepatic encephalopathy in East Asian populations. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(4):901-7.

247. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, Drögemöller BI, Pouladi MA, Leen R, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. 2019;380(15):1433-41.

248. De La Vega FM, Bustamante CD. Polygenic risk scores: a biased prediction? *Genome medicine*. 2018;10(1):100-.

249. Flud CR, Duarte-Rojo A. Prognostic Implications of Minimal/Covert Hepatic Encephalopathy: Large-scale Validation Cohort Studies. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2019;9(1):112-6.

250. Gomez EV, Rodriguez YS, Bertot LC, Gonzalez AT, Perez YM, Soler EA, et al. The natural history of compensated HCV-related cirrhosis: a prospective long-term study. *J Hepatol*. 2013;58(3):434-44.

251. Tapper EB, Parikh ND, Sengupta N, Mellinger J, Ratz D, Lok AS, et al. A risk score to predict the development of hepatic encephalopathy in a population-based cohort of patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2018;68(4):1498-507.
252. Ridola L, Riggio O. Prediction of hepatic encephalopathy: Why disregard well-known risk factors? 2018;67(4):1637-.
253. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2017;65(1):310-35.
254. Nardelli S, Lattanzi B, Torrisi S, Greco F, Farcomeni A, Gioia S, et al. Sarcopenia Is Risk Factor for Development of Hepatic Encephalopathy After Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt Placement. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(6):934-6.
255. Nardelli S, Lattanzi B, Merli M, Farcomeni A, Gioia S, Ridola L, et al. Muscle alterations are associated with minimal and overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis.0(ja).
256. Dam G, Vilstrup H, Watson H, Jepsen P. Proton pump inhibitors as a risk factor for hepatic encephalopathy and spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis with ascites. *Hepatology*. 2016;64(4):1265-72.
257. Tapper EB. Predicting Overt Hepatic Encephalopathy for the Population with Cirrhosis. *Hepatology*. 2019.

258. Pérez-Matos MC, Jiang ZG, Tapper EB. Factors That Affect Results of Psychometric Tests to Identify Patients With Minimal Hepatic Encephalopathy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2018;16(11):1836-8.
259. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD)2016.
260. Hirode G, Vittinghoff E, Wong RJ. Increasing Burden of Hepatic Encephalopathy Among Hospitalized Adults: An Analysis of the 2010-2014 National Inpatient Sample. *Dig Dis Sci*. 2019.
261. Abul-Husn NS, Cheng X, Li AH, Xin Y, Schurmann C, Stevis P, et al. A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(12):1096-106.

8 ANEXOS

8.1 Material suplementario

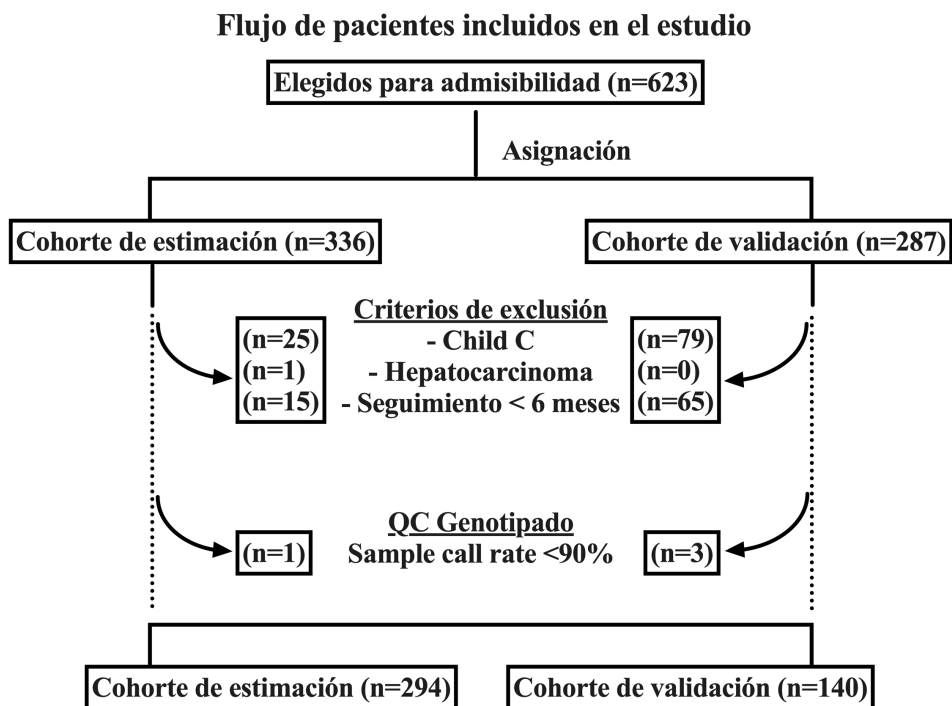


Figura S1. Flujo de pacientes en el estudio.